

Untersuchungen zur humoralen und zellulären Immunantwort auf HBs-Antigen
unter Berücksichtigung des Impfstatus

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von: Thomas Zeuner

Geburtsdatum, Geburtsort: 17.08.1984, Wriezen

angefertigt am: Institut für Klinische Immunologie
der Medizinische Fakultät der Universität Leipzig

Betreuer: Prof. Dr. med. Ulrich Sack

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 14.07.2015

Bibliographische Beschreibung

Zeuner, Thomas

Untersuchungen zur humoralen und zellulären Immunantwort auf HBs-Antigen unter Berücksichtigung des Impfstatus

Universität Leipzig, Dissertation

80 S., 131 Lit., 24 Abb., 3 Tab., 15 S. Anhang

Referat:

Die Virushepatitis gehört weltweit zu einer der häufigsten viralen Erkrankungen. Doch durch die Entwicklung von immer effizienteren Impfstoffen kann bei einer frühzeitigen Immunisierung eine Infektion verhindert werden. Ziel dieser Arbeit war es, ein Patientenkollektiv zu untersuchen, welches eine Impfung mit einem Hepatitis B-Impfstoff erhalten hatte, und dieses mit Probanden zu vergleichen, die nicht immunisiert waren. Diese Proben wurden auf ihre serologische und zelluläre Reaktivität mittels ELISA und ELISpot untersucht. Im ELISA zeigte sich bei 95 % der geimpften Personen eine positive Serokonversion nach zurückliegender Hepatitis B-Impfung. Um den Impfstatus genauer zu analysieren und bei seronegativen geimpften Probanden den zellulären Arm des Immunsystems zu verifizieren, wurde mittels ELISpot die IFN- γ -Sekretion von HBs-reaktiven T-Zellen untersucht und mit den Ergebnissen, welche in der Serologie gewonnen wurden, verglichen. Dabei zeigte sich, dass die zelluläre Untersuchung bei 43 von 94 untersuchten Patientenproben (46 %) ein positives Ergebnis aufwies. Zweiundzwanzig der 48 geimpften Patienten (46 %) hatten eine antigenspezifische IFN- γ -Sekretion und 21 der 46 Proben der aktuell nicht geimpften Patienten fielen im ELISpot positiv aus. Bei zwei seronegativ geimpften Patienten konnte jeweils ein positives Ergebnis im ELISpot gezeigt werden. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Höhe des anti-HBs-Titers im ELISA und Anzahl der spot-bildenden Zellen im ELISpot konnte nicht gezeigt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die serologische Untersuchung mittels ELISA weiterhin als Goldstandard verwendet werden soll, um den aktuellen Schutz gegenüber einer Hepatitis B-Infektion zu verifizieren. Durch die zelluläre Untersuchung mit dem ELISpot-Verfahren kann bei weiterer Testoptimierung in Zukunft eine Nachweismethode für seronegative Geimpfte entwickelt werden. Vor allem sollten diese mit Hilfe des ELISpots genauer analysiert werden, um gegebenenfalls bei nicht vorhandener humoralen Immunität und einer ebenfalls fehlenden zellulären Immunität prophylaktische Maßnahmen einzuleiten.

Inhaltsverzeichnis

Bibliographische Beschreibung

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Das Hepatitis B – Virus	1
1.2. Entdeckung	1
1.3. Taxonomie	2
1.4. Sero- und Genotypen	2
1.5. Morphologie	3
1.6. Genomstruktur	5
1.7. Die viralen Proteine	6
1.7.1. Die Polymerase	6
1.7.2. HBsAg-Oberflächenantigene	6
1.7.3. HBcAg- und HBeAg-Kapsidprotein	6
1.7.4. HBxAg	7
1.8. Der Lebenszyklus des Hepatitis B-Virus	7
1.9. Immunpathogenese	9
1.10. Hepatitis B-Virus-Infektion-Epidemiologie	11
1.11. Die Hepatitis B-Infektion	13
1.12. Immunisierung	14
1.13. Diagnostik	15
1.14. Zielsetzung	15
2. Material und Methoden	17
2.1. Ethikvotum	17
2.2. Probandenkollektiv	17
2.3. Probenentnahme und Lagerung	17
2.3.1. Blutgewinnung	17
2.3.2. Lymphozytenpräparation	18
2.3.3. Einfrieren	18

2.3.4.	Auftauen	19
2.3.5.	Manuelle Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer Zählkammer	19
2.4.	Material und Reagenzien	20
2.4.1.	Geräte	20
2.4.2.	Antikörper und Antigene	21
2.4.3.	Reagenzien	22
2.5.	Methoden	23
2.5.1.	Immunologische Nachweismethoden	23
2.5.1.1.	ELISA	23
2.5.1.2.	ELISpot	25
2.5.2.	Computerassistierte Auswertung	26
2.5.3.	Statistische Weiterverarbeitung	27
3.	Ergebnisse	28
3.1.	Probandenkollektiv	28
3.2.	ELISA	30
3.3.	ELISpot-Vorversuche	38
3.4.	ELISpot	41
3.5.	Vergleich ELISA und ELISpot	52
4.	Diskussion	57
5.	Zusammenfassung der Arbeit	67
6.	Literaturverzeichnis	70
7.	Anhang	81
7.1.	Patienteninformation	81
7.2.	Messwerte – ELISA und ELISpot	82
7.3.	Selbstständigkeitserklärung	93
7.4.	Danksagung	94
7.5.	Lebenslauf	95

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	-	Abbildung
Ag	-	Antigen
AK	-	Antikörper
ALAT	-	Alanin-Aminotransferase
APZ	-	antigenpräsentierende Zelle
AuAG	-	Australian Antigen
AUC	-	Area under the curve
BC	-	Buffy-Coat
BCIP/NBT	-	5-Brom-4-chlor-3-indolyolphosphat / Nitro Blue Tetrazolium
Bcl-2	-	B-cell lymphoma 2
BIM	-	Bcl-2-like protein 11
°C	-	Grad Celsius
cccDNA	-	covalently closed circular DNA
CD	-	cluster of differentiation (Zelloberflächenantigen)
CDR	-	complementarity determining regions
CO ₂	-	Kohlenstoffdioxid
DMSO	-	Dimethylsulfoxid
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	-	Doppelsträngige DNA
ELISA	-	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ELISpot	-	Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay
ER	-	endoplasmatisches Retikulum
et al.	-	et alii oder et aliae (Bedeutung: und andere)
FKS	-	Fötales Kälberserum
g	-	Gramm
HB	-	
HBcAg	-	Hepatitis B core Antigen
HBeAg	-	Hepatitis B envelope Antigen
HBsAg	-	Hepatitis B surface Antigen
HBIG	-	Hepatitis B-Immunglobulin
HBV	-	Hepatitis B-Virus
HIV	-	Humanes Immundefizienz-Virus
HCC	-	Hepatozelluläres Carcinom
HSP70	-	Heat-Shock-Protein 70 (Hitze-Schock-Protein)
HSP90	-	Heat-Shock-Protein 90 (Hitze-Schock-Protein)
IFN	-	Interferon
IfSG	-	Infektionsschutzgesetz
IgG	-	Immunglobulin G oder Gammaglobulin
IgM	-	Immunglobulin M
IL	-	Interleukin

kB	-	Kilobasen
kD	-	Kilodalton
lHBsAg	-	large Hepatitis B surface Antigen
Lw	-	Leerwert
mHBsAg	-	middle Hepatitis B surface Antigen
MHC	-	major histocompatibility complex
min	-	Minute
ml	-	Milliliter
mm	-	Millimeter
mm ²	-	Quadratmillimeter
mRNA	-	messenger RNA
n	-	Größe der Grundgesamtheit
nm	-	Nanometer
NO	-	Stickstoffmonoxid
NPV	-	negativer prädiktiver Wert
nt	-	nucleotide
o. A.	-	ohne Autor
p	-	Signifikanzwert, Überschreitungswahrscheinlichkeit
PBMC	-	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	-	phosphate buffered saline
PCR	-	Polymerase-Kettenreaktion
pgRNA	-	prägenomische RNA
PHA	-	Phythämagglutinin
PK	-	Proteinkinase
POD	-	Peroxidase
PPV	-	positiver prädiktiver Wert
Pr	-	Primerdomäne
RKI	-	Robert-Koch-Institut
RNA	-	Ribonukleinsäure
ROC	-	Receiver Operating Characteristic
RPMI	-	Roswell Park Memorial Institute
RT	-	Reverse Transkriptase
SEM	-	standard error of mean
SEN	-	Sensitivität
SFC	-	spot-forming cell
sHBsAg	-	small Hepatitis B surface Antigen
SOP	-	Standard Operating Procedure
SPE	-	Spezifität
STIKO	-	Ständige Impfkommision

Tab.	-	Tabelle
TH	-	T-Helfer(-Zellen)
TMB	-	Tetramethylbenzidin
TNF	-	Tumornekrosefaktor
U	-	Umdrehungen
vs	-	versus
WHO	-	World Health Organization – Weltgesundheitsorganisation
µg	-	Mikrogramm
µl	-	Mikroliter

1. Einleitung

1.1. Das Hepatitis B-Virus

Hepatitis beschreibt ein akut oder auch chronisch verlaufendes Krankheitsbild, welches primär die Leber involviert und sekundär weitere Organsysteme angreifen und dauerhaft schädigen kann.

Die Auslöser dafür sind mannigfaltig und umfassen sowohl Noxen (z. B. Medikamente, Alkohol, Pilzgifte), Autoimmunreaktionen als auch infektiöse Erreger. Dazu zählen Bakterien, Protozoen oder Viren.

Die Virushepatitis gehört neben den respiratorisch, exanthematösen und gastrointestinalen Viruserkrankungen weltweit zu den häufigsten viralen Erkrankungen.

1.2. Entdeckung

Die Geschichte der Hepatitis lässt sich bis ins 5. Jahrhundert vor Christus zu Hippocrates zurückverfolgen. Er beschrieb erstmals eine Krankheit, welche mit einer Gelbsucht - dem Leitsymptom der Hepatitis-Infektion - einherging (Zuckerman et al., 2005). In den Geschichtsbüchern des Jahres 1883 findet man Hinweise auf eine Hepatitis-Epidemie im Rahmen einer Pockenschutzimpfung, bei der 15 % der Geimpften eine Gelbsucht entwickelten (Lürmann, 1885). Man ging deshalb damals schon von einem parenteralen Übertragungsweg aus.

Die Bezeichnung Hepatitis B (MacCallum FO, 1947) konnte aufgrund der extremen Spezies- und Zelltypspezifität lange nicht einem Virus zugeordnet werden. Erst im Jahr 1965 gelang es Baruch Blumberg zufällig, bei Untersuchungen von australischen Ureinwohnern mit Leukämie ein unbekanntes Antigen zu entdecken, welches in einer Reihe von Folgestudien in Zusammenhang mit Hepatitis B-Infektionen gebracht werden konnte. Aufgrund der Herkunft benannte Blumberg das Antigen „Australien Antigen“ (AuAg) (Blumberg et al., 1965, 1967). Dane gelang es 1970 erstmals mit Hilfe elektromikroskopischer Untersuchungen, einen ca. 42 nm großen Viruspartikel - bestehend aus DNA und einem zentralen Antigen (HBcAg) - in AuAg-positiven Seren nachzuweisen (Dane et al., 1970).

In den folgenden Jahren wurde das Hepatitis B-Virus kloniert und als erstes humanpathogenes Virus sequenziert und konnte somit besser verstanden und erforscht werden (Galibert et al., 1979; Pasek et al., 1979; Sninsky et al., 1979; Tiollais et al., 1981).

1.3. Taxonomie

Das Hepatitis B-Virus gehört zur Familie der Hepadnaviriden. Die Hauptcharakteristika der hepatotropen DNA-Viren sind die Replikation des viralen partiellen doppelsträngigen Genoms mittels einer reversen Transkriptase und eine charakteristisch hohe Spezies- und Zelltyp-Spezifität. Aufgrund der Unterschiede in der Genomorganisation und daraus folgender Spezieszugehörigkeit erfolgt eine weitere Unterteilung in Orthohepadnaviren, die Säugetiere betreffen, und Avihepadnaviren, welche Vögel befallen (Schaefer, 2007).

1.4. Sero- und Genotypen

Zurzeit sind zehn Genotypen und verschiedene Serotypen des Hepatitis B-Virus bekannt (Arauz-Ruiz et al., 2002; Jayalakshmi et al., 2013).

Die serologischen Subtypen unterscheiden sich aufgrund eines Austauschs von Aminosäuren in der s-Domäne der Hüllproteine (Couroucé-Pauty et al., 1983; Delius et al., 1983). Auf dem HBsAg-Abschnitt befindet sich bei allen Subtypen eine konstante a-Determinante und zwei Subtyp-Determinanten [d oder y und w1 - w4 oder r], welche sich wie Allelpaaire verhalten (Magnius & Norder, 1995). Des Weiteren wurde noch die weiteren Subdeterminanten q⁺ und q⁻ identifiziert (Peterson et al., 1984). Es resultieren daraus folgende Subtypen: adr, ayr, ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, adw2, adw4, adrq⁺ und adrq⁻ (Guirgis et al., 2010).

Die Unterscheidung der einzelnen Genotypen (A - J) geschieht durch DNA-Analyse des Hepatitis B-Virus-Genoms und muss einen Mindestunterschied von 7,5 % im Vergleich zum Gesamtgenom aufweisen, um einen neuen Genotyp zu begründen (Kramvis et al., 2008; Norder et al., 1992; Okamoto et al., 1988).

Auch der Vergleich einer Teilsequenz kann herangezogen werden, muss sich aber in 4,1 % des zu vergleichenden Abschnittes unterscheiden. Der Unterschied ist meist in der HBs-Gensequenz zu finden.

Die Genotypen weisen durchaus unterschiedliche geografische Verteilungen auf. So sind die A- und D-Typen sehr häufig in Europa und den USA vertreten, während die Typen B und C überwiegend in China und Südostasien auftreten (André, 2000; Kurbanov et al., 2010; Stuyver et al., 2000; Tanaka, 2000) (Abb. 1).

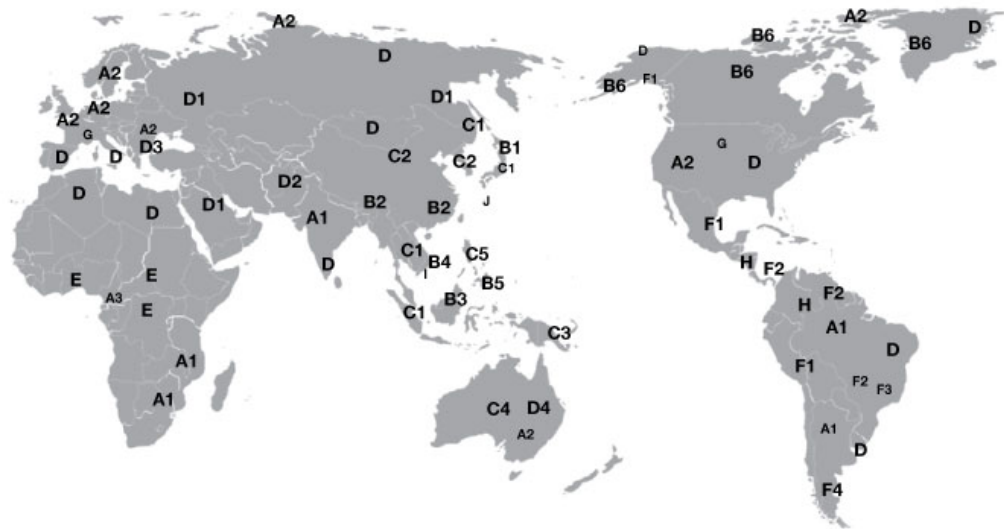


Abbildung 1: Geographische Verteilung der HBV-Genotypen und Subgenotypen (Kim et al., 2011)

1.5. Morphologie

Das Hepatitis B-Virus ist ein 42 nm großes, sphärisch umhülltes DNA-Virus mit überwiegend doppelsträngigem Genom.

In der Lipidhülle, welche das Virus umgibt, sind in ca. 240 Kopien des Hepatitis B surface-Antigen (HBsAg) verankert (Almeida et al., 1971). Dieses kann in drei verschiedenen Formen vorkommen: als großes (large HBsAg), als mittleres (middle HBsAg) und als kleines (small HBsAg) Protein.

Im Inneren des Virus befindet sich ein ikosaedrisches Kapsid mit einem Durchmesser von 28 - 34 nm, welches aus 180 - 240 dimerisierten Vorläufern des Kapsid-Proteins (Hepatitis B core Antigen, HBcAg (Gerety et al., 1975)) zusammengesetzt ist. Außerdem umhüllt das

Kapsid die Nukleinsäure, die virale Polymerase und die zelluläre Proteinkinase C (Conway et al., 1997; Zhou et al., 1992).

Nicht nur der infektiöse Partikel ist im Blut infizierter Patienten vorhanden, sondern auch zwei morphologisch sehr unterschiedliche nicht-infektiöse Partikel (Almeida, 1972; Bayer et al., 1968). Neben einem aus sHBsAg bestehendem sphärischem Partikel mit einem Durchmesser von 22 nm existiert noch ein filamentöser Partikel mit einer variablen Länge von 50 - 300 nm, der aus allen drei Hüllproteinarten besteht, jedoch keine Nukleinsäure enthält (Gerlich & Kann, 2005; Hitzeman et al., 1983) (Abb. 2).

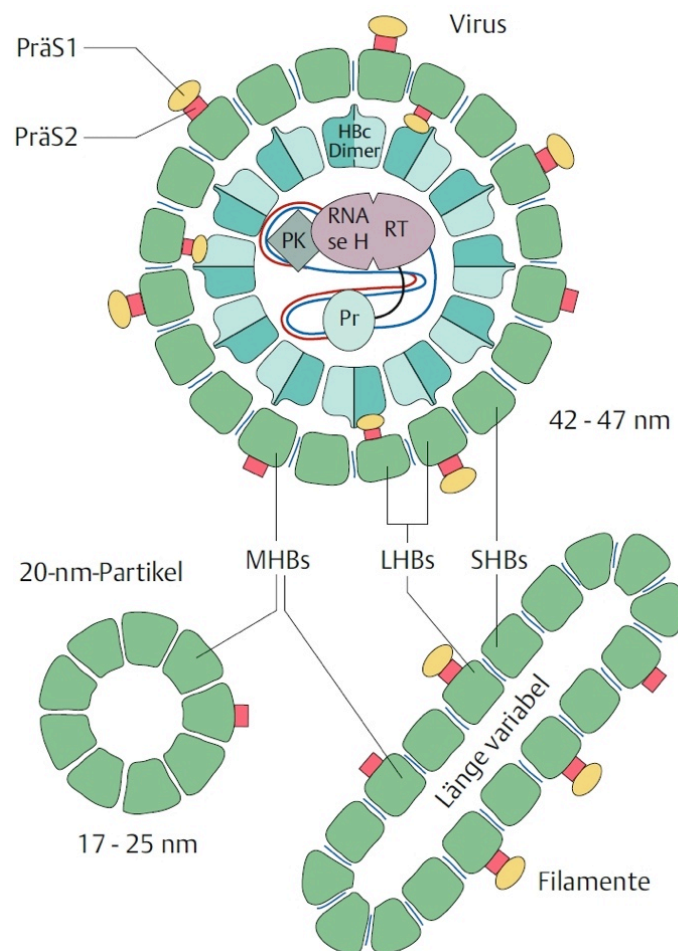


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Virions und der subviralen Partikel vom Hepatitis B-Virus, Hüllproteine (LHBs, MHBS und SHBs) mit s-Domäne (grün), präS1-Domäne (gelb) und präS2-Domäne (rot); partiell doppelsträngige DNA (blau/rote Linie); reverse Transkriptase (RT) mit RNase H Funktion und Primerdomäne (Pr), PK: Proteinkinase (Schaefer et al., 2010)

1.6. Genomstruktur

Das Genom des Hepatitis B-Virus mit einer Genomlänge von ca. 3,2 kB (3182 - 3248 nt [je nach Genotyp D / G]) zählt zu einer der kleinsten aller bisher bekannten Viren. Es besteht aus zirkulärer partieller doppelsträngiger DNA, wobei der Minusstrang vollständig intakt ist (Magnius & Norder, 1995; Stuyver et al., 2000). Der Plusstrang besitzt mit einer variablen Länge nur 40 bis 85 % des gesamten Genoms (Hruska et al., 1977; Landers et al., 1977; Robinson et al., 1974; Summers et al., 1975). Die beiden Enden des Minusstranges sind im Bereich des 5'-Endes um 8 - 10 nt überlappend und kommen somit in diesem Bereich als dreisträngiges Genom vor und sind entscheidend an der DNA-Replikation beteiligt (Will et al., 1987). Das 5'-Ende des Minusstranges ist kovalent mit der Primer-Domäne der viralen Polymerase verbunden.

Auf dem Minusstrang befinden sich vier - teilweise überlappende - offene Leserahmen, welche die viralen Polymerase (reverse Transkriptase, RNase H, DNA-Polymerase), das Hepatitis B surface Antigen (HBsAg), das core Antigen (HBcAg) bzw. die modifizierte Form des core Antigens (HBeAg) und einen X-Bereich kodieren (Gerlich & Kann, 2005) (Abb. 3).

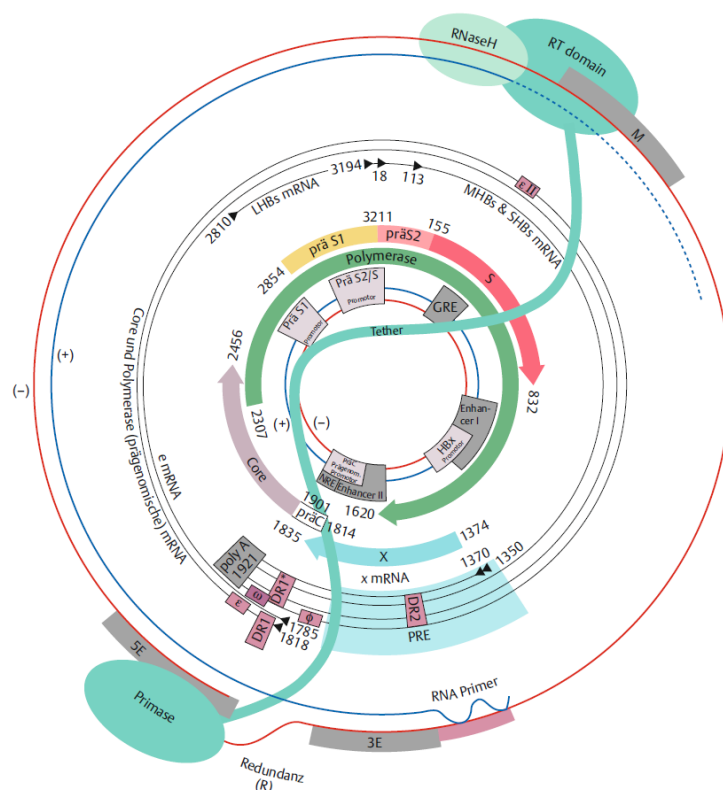


Abbildung 3: Struktur der DNA (äußere Kreise) mit der 5'-kovalent gebundenen Primerdomäne (Primase) sowie Reverse Transkriptase (RT) und RnaseH-Domäne am 3'-Ende des Plusstranges (Schaefer et al., 2010)

1.7. Die viralen Proteine

1.7.1. Die Polymerase

Der größte Leserahmen, die P-Genregion, umfasst etwa 80 % des gesamten Genoms und kodiert für die virale Polymerase (Bavand & Laub, 1988).

Diese besitzt eine Länge von 834 - 845 Aminosäuren und eine Molmasse von 92 kD.

Dieses multifunktionale Enzym besitzt vier Domänen. Der aminoterminal Bereich stellt die Primase-Domäne, ein sich anschließender noch nicht zuordnungsbarer Teil (Spacer), die RT-Domäne und die RNase H-Domäne dar (Faruqi et al., 1991).

Die P-Proteine spielen für den Mechanismus der Replikation eine essenzielle Rolle (Tiollais et al., 1985). Die Polymerase weist in der strukturellen und sequenziellen Hinsicht starke Ähnlichkeit zur reversen Transkriptase der Retroviren auf.

1.7.2. HBsAg – Oberflächenantigene

Die Hüllproteine des Hepatitis B-Virus werden im PräS- bzw. S-Leserahmen der Virus-DNA kodiert. Sie unterscheiden sich in Größe [small (sHBsAg), middle (mHBsAg), large (lHBsAg)] und Glykosylierungszustand (fakultative oder obligatorisch).

Bei der Häufigkeitsverteilung der unterschiedlich großen zirkulierenden HBsAg besitzt das sHBsAg den größten Anteil, gefolgt vom mHBsAg (5 - 15%) und lHBsAg (1 - 2%). Ein wesentlicher Unterschied dieser drei ist das Vorkommen in verschiedenen Lokalisationen des Virus. Dabei stellt das lHBsAg eine Ausnahme dar, da es in großer Menge in der Virushülle vorhanden und in den subviralen Partikeln nicht nachweisbar ist. Das mHBsAg dagegen kommt auf allen Partikeln gleich häufig vor.

1.7.3. HBcAg- und HBeAg-Kapsidprotein

Das Protein für das virale Kapsid umfasst ca. 183 - 185 Aminosäuren, hat eine Molmasse von 21 kD und wird in der C-Region der DNA kodiert.

Die Hauptfunktion des HBcAg ist die Erhaltung der Virusstruktur und Verpackung prägenomischer RNA.

Das Hepatitis B core Antigen ist für die Transportvermittlung des viralen Genoms in den Nucleus der infizierten Zelle und dem damit einhergehenden Anstieg der Hepatitis B Virus-DNA im Kern zuständig.

Das HBeAg wird ebenfalls in diesem Leserahmen kodiert und hat im Vergleich zum HBcAg einen aminoterminalen Bereich, auch PräC-Region genannt, welcher im Gegensatz zur C-Region nur das HBeAg kodiert.

Ein Signalpeptid entsteht als Produkt aus dem translatierten PräC-Abschnitt und führt zur Freisetzung des Polypeptids in das ER-Lumen. Diese Translokation erfolgt nicht vollständig und hinterlässt ein 24 kD großes HBeAg im Zytosol. Das Signalpeptid wird durch eine zelluläre Peptidase abgespalten und in einem zweiten Schritt das Antigen auf 16 kD verkürzt, was nun zum Export aus der Zelle fähig ist bzw. in die Blutbahn ausgeschleust werden kann (Takahashi et al., 1983). Aus diesem Grund findet man bei hochvirämischen Virusträgern das lösliche HBeAg im Serum vor. Dabei ist die Konzentration um ein Vielfaches höher als die des HBcAg.

1.7.4. HBxAg

Das X-Gen hat einer Länge von 154 Aminosäuren und eine Molmasse von 16 - 18 kD. Seine genaue Funktion ist noch nicht komplett erforscht, aber man vermutet einen Zusammenhang zwischen der viralen Genexpression und den direkten und indirekten Effekten auf den Infizierten (Ganem & Schneider, 2001; Zoulim et al., 1994).

Die X-Proteinaktivität ist außerdem essenziell für die in-vivo-Replikation und Ausbreitung des Virus (Zoulim et al., 1994).

1.8. Der Lebenszyklus des Hepatitis B-Virus

Das Hepatitis B-Virus gehört zu den Hepadnaviren und hat somit primär die Hepatozyten des Menschen als Zielzelle, in die er über Rezeptor-vermittelte Bindung, Endozytose oder Fusion mit der Zellmembran gelangt.

In verschiedenen Arbeiten wurden unterschiedliche zelluläre Rezeptoren für den Virus beschrieben, unter anderem Annexin V, Endonexin III, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-

Dehydrogenase und ein Asialoglykoprotein-Rezeptor (de Bruin et al., 1994; Hertogs et al., 1993; Petit et al., 1997; Pontisso et al., 2000; Treichel et al., 1997).

Im Gegensatz dazu gibt es für den viralen Rezeptor nur eine Bindungsstelle, welche Bestandteil der PräS-Region von IHBsAg und mHBsAg ist und eine starke Affinität zu Albumin hat. Das spricht für eine spezifische Anheftungsstelle des Hepatitis B-Virus, die über Serumalbuminvermittlung erfolgt (Thung & Gerber, 1984).

Nach der Aufnahme in die Zelle kommt es im Zytosol zur Hüllenabspaltung, wodurch das Kapsid mit den Core-Partikeln frei wird und zu den Kernporen des Zellkerns gelangt (Kann et al., 1997). Der Transport zum Kern erfolgt direkt und aktiv mit der Hilfe von Mikrotubuli (Kann et al., 2007).

Am 26 nm großen Kernporenkomplex kommt es zur Auflösung des Kapsids (32 - 36 nm). Somit ist nun die Einschleusung der genomischen DNA über eine Vermittlung mit Hilfe der viralen Polymerase bzw. einer Phosphorylierung des Core-Partikels in den Zellkern möglich (Kann et al., 1997).

In früheren Arbeiten wurde aber auch gezeigt, dass das intakte Kapsid über den Kern-Proteinkomplex in den Nukleus gelangen kann (Panté & Kann, 2002). Dort kommt es zur Freisetzung der partiellen dsDNA, welche durch die virale DNA-Polymerase, von dem inkompletten Plusstrang und Wirtzellenzymen in cccDNA umgewandelt wird und im nächsten Schritt als Vorlage für die Transkription der viralen und prägenomischen mRNAs dient (Tuttleman et al., 1986). Dieser Schritt erfolgt durch die zelluläre DNA-abhängige RNA-Polymerase II. Die virale RNA wird danach ins Zytoplasma transportiert und translatiert.

Bei der Translation entstehen die Virushülle (HBsAg), der Viruskern (HBcAg), die virale Polymerase und die X- und PräC-Polypeptide.

Der Zusammenbau erfolgt zunächst durch Dimerisierung und Zusammenlagerung von Core-Proteinen zu vollständigen Kapsiden (Chang et al., 1994; Seifer et al., 1993; Zhou et al., 1992). Anschließend kommt es zur Verpackung der HBV-pgRNA und Aktivierung der viralen Polymerase mit Hilfe von zellulären HSP90-Chaperone und einer darauf folgenden Synthese der beiden viralen DNA-Stränge unter Inanspruchnahme der reversen Transkriptase (Hu & Seeger, 1996; Pollack & Ganem, 1994).

Als Vorlage für den ersten DNA-Strang (Minusstrang) dient die zytoplasmatische pgRNA, welche darauf wieder abgebaut wird. Der entstandene DNA-Abschnitt dient nun als Template für den Plusstrang.

Die Kapside, mit der nun reifen partiell doppelsträngigen DNA, werden zum einen am ER mit den viralen Oberflächenproteinen umhüllt und zum anderen wieder in den Kern zurücktransportiert. Vor Ort wird die DNA in cccDNA zurückkonvertiert, um einen gleichbleibenden intrazellulären Pool an Transkriptions-Templats zu gewährleisten. Dabei spielen für die Morphologie des HBV vor allem die IHBsAg und sHBsAg eine entscheidende Rolle.

Zur Sicherstellung, dass genügend Hüllproteine vorhanden sind, dient ein Retentionssignal, welches in der PräS1-Sequenz liegt, da auch subvirale Partikel ohne Nukleinsäure am ER umhüllt werden und mit HBsAg-Bestandteilen die Zelle verlassen (Gallina et al., 1995).

Nach Fertigstellung der Kapside kommt es zur Sekretion des Virions, welche durch das Vorhandensein des sHBsAg bedingt ist.

1.9. Immunpathogenese

Die Immunantwort bei HBV-Infektion wird sowohl durch spezifische zelluläre Hepatitis B-Virus-Antigene als auch durch unspezifische Antigene initiiert.

Bei der humoralen Immunantwort kommt es zur Induktion von spezifischen antikörperproduzierenden B-Zellen, die von allen viralen Hepatitisantigenen (außer HBxAg) getriggert werden können.

Die Erkennung der Antigene durch die B-Zellen erfolgt mit Hilfe von Immunglobulinen. Diese werden membrangebunden als B-Zellrezeptor oder als freie Antikörper produziert. Nach Bindung an den B-Zellrezeptor erfolgt die Aufnahme des löslichen Antigens in die Zelle (Antigen-Antikörperkomplex), um dort weiter prozessiert zu werden. Einzelne Peptide des Virusantigens werden auf der Oberfläche der B-Zelle präsentiert und führen zur Aktivierung von T-Helferzellen. Es kommt zur Proliferation und Differenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen. Die Zelle kann spezifische Antikörper sezernieren, welche eine Infektion durch Inhibierung der toxischen Effekte oder im Zuge der Bindung des Pathogens die Infektiosität verhindern. Diese neutralisierenden Antikörper sind gegen die Hepatitis B-Virus-Oberflächenproteine (HBsAg) gerichtet und spielen eine wichtige Rolle bei der Viruselimination

und dem Reinfektionsschutz. Anti-HBs-AK vernetzen freie Virionen zu Immunkomplexen und ermöglichen somit ihre Entfernung aus der Zirkulation. Das hat zur Folge, dass die Infektion weiterer Zellen verhindert wird (Chisari, 1997).

Auch die Produktion weiterer Antikörper gegen andere Proteine des Hepatitis B-Virus ist von großer Bedeutung. IgM-Antikörper gegen HBcAg sind nur in der frühen Phase der Infektion vorhanden. Die anti-HBc-IgG persistieren auf Lebenszeit im Blut. Anti-HBe-AK und anti-HBs-AK sind erst später nachzuweisen. Sie werden aber als ein Zeichen für einen günstigen Verlauf der Infektion gewertet (Kajino et al., 1994).

Die zelluläre Immunantwort geht von naiven T-Zellen aus, die nach Fremdantigenkontakt zu T-Effektorzellen differenzieren. Die Erkennung von viralen Antigenen durch die T-Zellen erfolgt durch kurze, nichtkovalent gebundene Peptidfragmente an spezifischen MHC-Molekülen, die sich auf antigenpräsentierenden Zellen (MHC Klasse II) bzw. Targetzellen (MHC Klasse I) befinden (Chisari, 1999).

MHC-Moleküle gehören zu den Glykoproteinen, die membranständig auf der Oberfläche von Zellen vorkommen. Sie sind für die Antigenerkennung der T-Zellen notwendig, da deren Rezeptoren MHC-restringiert sind. Sie binden sowohl körpereigene als auch körperfremde Peptide und dienen somit den Immunzellen zur Unterscheidung, ob es sich um ein nicht-eigenes Antigen handelt oder nicht.

Nach der Antigenerkennung kommt es zur Differenzierung und Proliferation der spezifischen T-Zellen und zur Induktion der zellulären Immunantwort.

Bei der HBV-Infektion dienen die T-Lymphozyten der Erkennung und Abtötung der infizierten Zelle sowie der Ausschüttung von Zytokinen, welche die Genexpression des Virus unterdrücken, ohne zu einer Zellschädigung zu führen (Chisari, 1997; Guidotti et al., 1994). Die dafür verantwortlichen zytotoxischen T-Zellen führen zur Viruslastverringering in Hepatozyten durch Lyse und zur Hemmung der Virusexpression sowie zur Reduktion der Replikation des Hepatitis B-Virus-Genoms (Guidotti et al., 1994). Diese Downregulation ist direkt verbunden mit der IFN- γ -Produktion der aktivierten CD8⁺-T-Zelle (Guidotti et al., 1996). Die Virus-RNA wird dabei durch Zytokin-induzierte Proteolyse - eines La Autoantigens - entfernt, was dazu führt, dass die RNA destabilisiert und für RNasen anfällig wird. Außerdem konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass es zur Induktion von NO-Synthasen kommt, welche den antiviralen Effekt von IFN- γ und TNF-alpha erhöhen (Guidotti et al., 2000; Heise et al., 2001).

Diese MHC Klasse-I-Antwort erfolgt hauptsächlich über die Prozessierung und Präsentation des HBsAg, wohingegen der MHC Klasse-II-Weg durch HBcAg und HBeAg induziert wird (Chisari, 1999).

Die Reduktion der Viruslast erfolgt durch die MHC Klasse-I-getriggerte T-Zellantwort. Diese zytotoxischen T-Lymphozyten (CD8+-T-Zellen) sind wesentlich an der Viruskontrolle beteiligt und diese erfolgt durch Induktion der Apoptose der infizierten Zelle sowie durch die Freisetzung von IFN- γ und TNF-alpha in der Anfangsphase der Infektion, welche die virale Genexpression und Replikation vollständig inhibieren (Guidotti et al., 1994).

Die MHC Klasse-II-getriggerte T-Zellantwort richtet sich vor allem gegen die Kapsidproteine (HBcAg und HBeAg). Eine T-Helferzellantwort (CD4+-T-Zelle) ist dabei gegen HBsAg deutlich schwächer und vor allem im sehr frühen Verlauf der Infektion nachweisbar (Ferrari et al., 1990; Jung et al., 1991; Vento et al., 1987). Generell ist davon auszugehen, dass die CD4+-T-Lymphozyten sechs Wochen nach der Infektion keinen relevanten Einfluss mehr auf den Verlauf haben und primär in der Frühphase der Infektion von Bedeutung sind (Thimme et al., 2003; Webster et al., 2000).

Im Rahmen der Impfung werden eine zelluläre sowie eine humorale Immunantwort ausgelöst. Der protektive Effekt wird hauptsächlich durch Antikörper vermittelt, womit der Infektionsschutz an das Vorhandensein von anti-HBs-AK gebunden ist. Jedoch wird auch unterhalb der empfohlenen Konzentration der Antikörper von 10 IE/l ein Schutz beschrieben. Durch das aufgebaute immunologische Gedächtnis kann die Ausbreitung des Virus und eine symptomatische Erkrankung unterbunden werden (Bauer & Jilg, 2006).

1.10. Hepatitis B-Virus-Infektion-Epidemiologie

Die Hepatitis B-Infektion ist eine der häufigsten viralen Infektionskrankheiten und stellt ein bedeutendes globales Gesundheitsproblem dar. Laut WHO waren weltweit schon ca. 30 % aller Menschen (2 Milliarden) mit dem Hepatitis B-Virus infiziert und 3 % (240 Millionen) leiden an einer chronischen Hepatitis B-Infektion. Im Gegensatz dazu hatten nur 3 % der Weltbevölkerung Kontakt mit dem Hepatitis C-Virus, von denen rund 170 Millionen als chronische Träger zu betrachten sind.

In Europa liegt die regionale Verbreitung des Hepatitis B-Virus zwischen 0,1 % bis 7 % (Abb. 4).

Die Hepatitis B-Infektion gehört in Deutschland zu den meldepflichtigen Erkrankungen gemäß IfSG und kann deswegen epidemiologisch sehr gut nachvollzogen werden. Außerdem laufen verschiedene Querschnittsstudien, die durch Schätzung die Verbreitung in der Gesamtbevölkerung sehr gut wiedergeben können. In der im Jahr 1998 durchgeführten Bundesgesundheitsurvey (BSG98) wurde eine Seroprävalenz für HBcAg (stattgefundene Infektion) von 7,7 % ermittelt. Die Prävalenz für eine aktuelle Infektion (HBsAg) wird jedoch auf nur 0,3 % geschätzt. Somit gehört Deutschland weltweit zu einem der Länder mit der niedrigsten Seroprävalenz für Hepatitis B. Im Jahr 2013 betrug in Deutschland die Inzidenz 0,8 Erkrankungen auf 100.000 Einwohner. Dies wird zurückgeführt auf die verbesserten Vorsorgemaßnahmen und bessere Datenerhebung. Die Zahl der akuten Hepatitis B-Fälle lag im Jahr 2013 bei 1.947 , wovon nur 691 Fälle der Referenzdefinition (durch fehlende Angaben von Symptomen) entsprachen (Robert-Koch-Institut, 2014).

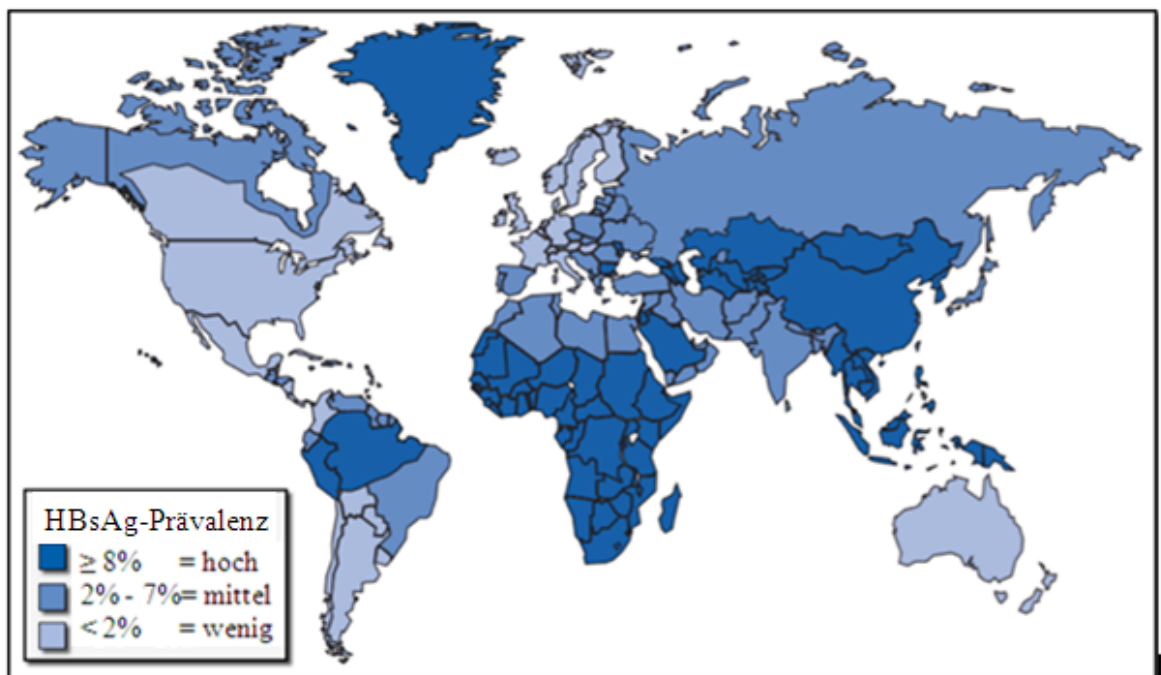


Abbildung 4: Geographisches Vorkommen von chronischer Hepatitis B-Infektion, gezeigt ist die HBsAg-Prävalenz in % (Weinbaum et al., 2008)

1.11. Die Hepatitis B-Infektion

Das Hepatitis B-Virus ist ein hepatotroper, parenteral-übertragener Erreger, welcher eine Inkubationszeit von acht Wochen und bis zu sechs Monaten haben kann.

Die dabei auftretenden Symptome können vielfältig sein, jedoch verläuft sie bei Jugendlichen und Erwachsenen in 65 % der Fälle subklinisch.

Eine akute Hepatitis beginnt mit einer ca. einwöchigen Prodromalsymptomatik (Abgeschlagenheit, Müdigkeit, Unwohlsein, Fieber), bei der auch extrahepatische Manifestationen (Urtikaria, Hauteffloreszenzen und Arthralgien) auftreten können. Ihr folgt eine ikterische Phase, die durch eine Billirubin verursachte Gelbfärbung der Haut im Zuge der Leberzellschädigung gekennzeichnet ist (Piñól Aguade & Mascaro, 1971; Toda, 1999).

Die eigentliche Ursache der Symptome ist nicht allein auf das Virus zurückzuführen, sondern geht vielmehr von der Wirtszellen vermittelten Immunabwehr aus, die zur Zerstörung der Hepatozyten führt (Chisari & Ferrari, 1995; Chisari, 1997).

In 5 - 10 % der Fälle nimmt die Hepatitis einen chronischen Verlauf. Jedoch liegt diese Zahl bei infizierten Neugeborenen durch prä- und perinataler Übertragung aufgrund der noch vorhandenen immunologischen Unreife bei ca. 95 % und nimmt dann mit steigendem Alter stetig ab (Chisari, 1997). Auch bei Patienten mit einer Immunschwäche - wie z. B. HIV-Infizierte, medikamentös Immunsupprimierte oder Dialysepatienten - ist die Chronifizierungsrate deutlich höher als bei Immunkompetenten. Anhalt für einen chronischen Verlauf zeigt eine Persistenz von HBsAg über mehr als sechs Monate nach akut durchgemachter Erkrankung. Jedoch bleiben bei den chronisch Erkrankten etwa 80 % symptomlos (gesunder HBsAg-Träger-Status). Bei 20 – 30 % können sie hingegen in eine Leberzirrhose übergehen. Auch das Risiko der Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms ist im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung um 100- bis 200-mal höher (Beasley et al., 1982; Gerlich & Kann, 2005). Ausschlaggebend dabei ist die Dauer des Vorhandenseins des HBsAg, welche nach einer Latenz von ca. 20 – 40 Jahren zu einem HCC führen kann.

1.12. Immunisierung

Die STIKO nahm 1995 die Hepatitis B-Impfung als Regelimpfung in den Impfkalender für Kinder auf und empfiehlt außerdem bei bestimmten Personengruppen die aktive Impfung.

Ein aktiver Impfstoff wurde in den 1970er Jahren aus den Seren hochvirämischer Träger entwickelt (Krugman & Giles, 1973; Krugman et al., 1971). Da das Infektionsrisiko bei der Verwendung dieses Präparates eine Gefahr darstellte, wurde Ende der 1970er Jahre die erste rekombinante Vakzine hergestellt. Das brachte auch den Vorteil der bedarfsgerechten Herstellung mit sich (Bitter et al., 1988; Harford et al., 1983; McAleer et al., 1984; Valenzuela et al., 1979, 1982).

Aktuell sind in Deutschland drei Hepatitis B-Impfstoffe auf dem Markt vertreten, Engerix-B (adw-Subtyp) der Firma *GlaxoSmithKline*, HBvaxPRO (adw-Subtyp) der Firma *Sanofi Pasteur MSD*, Twinrix (adw-Subtyp) der Firma *GlaxoSmithKline*.

Die Grundimmunisierung erfolgt durch dreifache Gabe des Impfstoffes – einen rekombinanten HBsAg (Assad & Francis, 1999; Venters et al., 2004). Der Impferfolg wird nach ein bis zwei Monaten durch die Bestimmung des anti-HBs-Titer getestet. Dieser ist ein sicheres Zeichen für die erfolgreiche Indizierung einer humoralen Immunantwort. Ein Antikörpertiter von >100 IE/l ist repräsentativ für einen Schutz von mindestens zehn Jahren. Eine Immunantwort wird nach den ersten beiden Impfungen von ca. 70 – 90 % der Geimpften induziert und bei Komplettierung sogar von 90 – 95 % (McLean et al., 1983; West, 1989; West et al., 1993). Die Zahl der Non-responder liegt somit bei ca. 5 %. Die passive Immunisierung erfolgt durch Gabe von Hepatitis B-Immunglobulinen (HBIG) und führt bei 65 – 80 % zu einem Schutz vor einer akuten Hepatitis (Grady et al., 1978; Palmović & Crnjaković-Palmović, 1993; Seeff et al., 1977). Diese Postexpositionsprophylaxe wird z. B. bei medizinischem Personal, nach Verletzungen mit infektiösem Material und bei Neugeborenen von HBsAg-positiven Müttern empfohlen. Jedoch ist die alleinige Gabe des HBIG bei perinataler Infektion nicht ausreichend, weil der Schutz nur einige Monate anhält. Danach kommt es zu einem Abfall des Antikörpertiters, weswegen man Kombinationsimpfungen mit aktivem und passivem Impfstoff durchführt. Dadurch wird ein 85 – 95%iger Schutz vor perinataler Übertragung und späterer Infektion gewährleistet (Stevens et al., 1985; Terrault & Vyas, 2003; Xu et al., 1985).

1.13. Diagnostik

Bei Verdacht auf eine Hepatitis B-Virus-Infektion oder zur Kontrolle des Impfstatus wird derzeit als Goldstandard der Nachweis virusspezifischer Antigene und/oder Antikörper durchgeführt. Als weitere Diagnostik kann man auch die Virus-DNA mittels PCR nachweisen.

Ein Vorhandensein von HBsAg im Serum steht für eine akute oder chronische Hepatitis B-Infektion und wird begleitet von Immunglobulinen, die spezifisch für das core Antigen sind (antiHBc-IgM bzw. -IgG). Im Laufe der Infektion, wenn ca. 75 - 100 % der Hepatozyten infiziert sind, wird HBeAg nachweisbar, das in Folge die entsprechenden Antikörper (anti-HBe) induziert (Kajino et al., 1994). Wenn es zur Leberzellschädigung kommt, führt dies zum Anstieg von ALAT; dieser Parameter spiegelt somit indirekt die nun stattfindende T-Zellantwort wieder. Sobald dies passiert, fallen die Virus-Titer ab. Im Zuge dessen werden auch HBsAg und HBeAg sowie die anti-HBs-Antikörper nachweisbar. Im Gegensatz dazu bleibt HBeAg bei einer chronischen Infektion vorhanden und gibt Aufschluss über die Aktivität der Hepatitis, da die Höhe der Konzentration mit der Anzahl der infektiösen Virionen korreliert. Im weiteren Verlauf kommt es zum Auftreten von anti-HBs und anti-HBe-Antikörpern. Ein Marker für den Kontakt mit dem Virus ist anti-HBc-IgG.

Der Impfschutz wird durch das Vorhandensein von anti-HBs-Antikörpern nachgewiesen, da alle in Deutschland zugelassenen Impfstoffe HBs als Antigen enthalten.

1.14. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von gegen Hepatitis B-Virus geimpften und nicht geimpften Personen auf serologische und zelluläre Reaktivität.

Unsere Ziele waren deshalb die Folgenden:

1. Die Entwicklung eines geeigneten Studiendesigns;
2. Die serologische Untersuchung der Patienten;
3. Die Entwicklung eines HBs-reaktiven ELISpot-Assays;
4. Die Bewertung der klinisch-diagnostischen Relevanz dieser Untersuchungen.

Im Einzelnen war dafür die Bearbeitung folgender Aufgaben erforderlich:

1. Einreichung eines Ethikantrages;
2. Rekrutierung der Probandengruppen;
3. Untersuchung der von diesen Probanden gewonnenen Proben auf eine Serokonversion;
4. Untersuchung der Zellen der Probanden auf die IFN- γ -Sekretion von HBs-reaktiven T-Zellen;
5. Vergleich der zellulären Ergebnisse mit den Daten, welche aus der Serologie gewonnen wurden;
6. Untersuchung von „Nichtkonvertern“, ob eine zelluläre Reaktion nach zurückliegender Impfung nachweisbar war und ob diese eine Aussagekraft bezüglich des aktuellen Impfstatus hat.

2. Material und Methoden

2.1. Ethikvotum

Diese Studie wurde der Ethikkommission der Universität Leipzig vorgelegt und genehmigt (Nummer 151/2006).

2.2. Probandenkollektiv

Das Kollektiv, der in dieser Arbeit untersuchten Probanden wurde über einen Zeitraum von drei Monaten in einer Allgemeinarztpraxis akquiriert. Es mussten folgende Kriterien erfüllt sein, um in diese Studie aufgenommen zu werden:

- ein Alter zwischen 16 und 50 Jahren,
- kein Vorhandensein von schweren Begleiterkrankungen,
- Ausschluss einer vorausgegangenen Therapie mit Immunsuppressiva,
- keine in der Eigenanamnese bekannte Hepatitis-Infektion,
- keine Schwangerschaft und ein Ausschluss immunsupprimierender Erkrankungen (z. B. HIV-Infektion).

2.3. Probenentnahme und Lagerung

2.3.1. Blutgewinnung

Die Probenentnahme erfolgte während einer ambulanten Sprechstunde nach Nachfrage beim Patienten, ob dieser mit einer Teilnahme an dieser Studie einverstanden sei. Es wurde dabei mittels eines Informationsbogens und Aufklärungsgespräches darauf hingewiesen, dass die Datenerfassung und Probeentnahme ohne Weitergabe der persönlichen Daten erfolgte (Patienteninformation- und Einwilligungserklärungsbogen im Anhang).

Es wurde eine Serumprobe (ca. 10 ml) und Heparinblut (ca. 5 ml) abgenommen. Diese wurden nach der Abnahme bei unveränderten Temperaturverhältnissen (Raumtemperatur) in das Institut für Klinische Immunologie der Uniklinik Leipzig gebracht und binnen 24 h weiter verarbeitet und untersucht.

2.3.2. Lymphozytenpräparation

Die entnommenen 5 ml Heparinblut wurden im Verhältnis 1 : 2 mit PBS verdünnt und langsam in ein 15 ml Einwegröhrchen über 2 ml Ficoll gegeben, ohne dass sich die zwei Phasen vermischten. Dieses Röhrchen wurde bei 1750 U/min (800 G) für 25 Minuten zentrifugiert. Der dabei entstandene Lymphozytenring zwischen Plasma und Ficoll wurde mittels Pipette abgesaugt und in ein 15 ml Röhrchen überführt, welches im Anschluss mit PBS aufgefüllt wurde. Danach erfolgt eine Zentrifugation bei 1400 U/min für zehn Minuten. Der Überstand wurde wiederum verworfen, die Zellen resuspendiert und das Röhrchen auf 15 ml mit PBS aufgefüllt. Eine letzte Zentrifugation bei 1250 U/min für zehn Minuten fand statt, bevor der Überstand verworfen und die dann resuspendierten Zellen in FKS aufgenommen werden konnten oder zum Einfrieren vorbereitet wurden. Alle Arbeiten wurden steril und bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.3.3. Einfrieren

Da nicht alle ELISpots sofort durchgeführt werden konnten, wurden die restlichen Zellen eingefroren.

Die Zellen wurden nach der Lymphozytenpräparation in 3 – 5 ml RPMI + 10% FKS aufgenommen und die Zellenzahl in einer Neubauer Zählkammer bestimmt (siehe Kapitel 2.2.5.). In einem Kryoröhrchen auf Eis wurden 400 µl FKS und 100 µl DMSO vorgelegt und die Zellen im 4 °C kalten FKS zugegeben. Nach Kennzeichnung der Röhrchen mit Barcode-etiketten wurden die Kryoröhrchen sofort in eine Nalgene Einfrierbox (mit Iso-Propanol gefüllt), welche im Kühlschrank (mindestens 4 h bei 2 – 8 °C gelagert) aufbewahrt werden muss, überführt und in den Gefrierschrank -80 °C gestellt. Am nächsten Morgen wurden die Kryoröhrchen aus der Nalgene-Box in eine -80 °C-Probekassette umgesetzt und bis zur weiteren Verarbeitung dort gelagert.

Dieses Protokoll wurde im Labor im Rahmen der Akkreditierung validiert und erlaubt eine Wiederfindung von > 90 % der eingefrorenen Zellen.

2.3.4. Auftauen

Als Vorbereitung wurde RPMI + 10%FKS (450 ml RPMI + 50 ml FKS) auf 37 °C vorgewärmt. Die aufzutauenden Kryoröhrchen wurden dem Gefrierschrank bei -80 °C entnommen und unverzüglich in das Wasserbad überführt. Im Anschluss wurde in ein 15 ml Röhrchen 1 ml des vorgewärmten FKS vorgelegt. Sobald das Medium im Kryoröhrchen zu etwa 50 % aufgetaut war, wurde dieses in das FKS überführt und bis 15 ml mit RPMI + 10%FKS aufgefüllt. Dann erfolgte eine Zentrifugation mit 1250 U/min für zehn Minuten. Nach nochmaligem Abgießen des Überstandes, Auffüllen auf 15 ml mit RPMI + 10%FKS und zehnminütiger Zentrifugation bei 1250 U/min wurde anschließend der Zellüberstand verworfen und das übrige Zellpellet erneut in 2 ml RPMI + 10%FKS resuspendiert. Aus diesem wurden zuletzt 50 µl für die Zellzahlbestimmung entnommen. Der Rest wurde auf 10 ml mit RPMI + 10%FKS aufgefüllt und acht Minuten bei 1250 U/min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und die gewünschte Zellzahl durch Zugabe von RPMI + 10%FKS eingestellt.

2.3.5. Manuelle Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer Zählkammer

Die 50 µl der Zellsuspension wurden mit 50 µl Trypanblau vermischt und auf einen Objektträger gegeben. Diese Methode erlaubt zugleich den Vitalitätsnachweis der wieder aufgetauten Zellen. Unter dem Mikroskop bei zehnfacher Vergrößerung wurden 4 x 4 Kleinquadrate (d.h. ein Großquadrat) in diagonalen Richtung ausgezählt und die Gesamtzellzahl durch Berechnung bestimmt.

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{gezählte Zellen} \times \frac{1}{\text{Tiefe [mm]}}}{\text{Fläche [mm}^2\text{]} \times \text{Verdünnung}}$$

$$\text{Fläche eines Großquadrates} = 1 \text{ mm}^2$$

$$\text{Tiefe der Zählkammer} = 0,1 \text{ mm}$$

$$\text{Verdünnung} = 2$$

Die Zahl der Zellen pro Milliliter errechnete sich aus dem Mittelwert der Zellzahl $\times 2 \times 10^4$.

2.4. Material und Reagenzien

2.4.1. Geräte

Bechergläser	VitLab – Großostheim, Deutschland
BEP III	Siemens AG - Erlangen, Deutschland
Brutschrank	NAPCO – Waltham, USA
ELISpot Reader	AID – Straßberg, Deutschland
Feinwaage	Sartorius AG – Göttingen, Deutschland
Gefrierschrank	Liebherr - Biberach an der Riss, Deutschland
Kühlzentrifuge Rotina 46RS	Hettich – Tuttlingen, Deutschland
Kryoröhrchen	Nalge Nunc International – Penfield, USA
Laborflaschen 125 ml - 1000 ml	Nalge Nunc International – Penfield, USA Biochrom – Berlin, Deutschland
Messzylinder	Vagra - DDR
Mikroskop	Helmut Hund GmbH – Hund, Deutschland
Multipette mit Spitze	Eppendorf – Hamburg, Deutschland
MutliScreen HTS-IP Filter Plates	Merck Millipore – Darmstadt, Deutschland
Neubauer Zählkammer	LO – Laboroptik – Lancing, England
Pipettenspitzen, kristall, gelb, blau	Sarstedt – Nümbrecht, Deutschland
Polypropylen Einwegröhrchen 15/50 ml	Sarstedt – Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten 5/10 ml	Sarstedt – Nümbrecht, Deutschland
Pasteurpipette, steril	Greiner Bio-One – Frickenhausen, Deutschland
Sterilbank	Clean Air Techniek B.V. - JA Woerden, Niederlande
Vacutainer®Heparinröhrchen	BD – Heidelberg, Deutschland
Vacutainer®Serumröhrchen	BD – Heidelberg, Deutschland

2.4.2. Antikörper und Antigene

Anti-human IFN- gamma; mAb 1-D1K	Mabtech - Nacka Strand, Schweden
Anti-human IFN- gamma; mAb 7- B6-1-Biotin	Mabtech - Nacka Strand, Schweden
CMV-Antigen	AID – Straßberg, Deutschland
Diphtherie-Antigen	Statens Serum Institut – Kopenhagen, Dänemark
Mycobakterium tuberculosis Antigen ESAT-6	AID – Straßberg, Deutschland
PHA-Antigen	Sigma-Aldrich – St. Louis, USA
Rekombinantes Hepatitis B surface Antigen, adw (= Antigen1) (Source: Pichia Pastoris)	ProSpec-Tany Technogene (ProSpec) – Rehovot, Israel
Rekombinantes Hepatitis B surface Antigen, adw (= Antigen2) (Source: Pichia Pastoris)	BIOTREND Chemikalien GmbH – Köln, Deutschland
Rekombinantes Hepatitis B surface Antigen, adr (= Antigen3) (Source: Saccharomyces cerevisiae)	Ibt - immunological and biochemical testsystems GmbH - Deutschland
Streptavidin-ALP	Mabtech - Nacka Strand, Schweden
Tetanus-Antigen	Statens Serum Institut – Kopenhagen, Dänemark

2.4.3. Reagenzien

Albumin bovine Fraktion V	Serva – Heidelberg, Deutschland
BCIP/NBT liquid substrate	Sigma-Aldrich – St. Louis, USA
DMSO	Merck Millipore – Darmstadt, Deutschland
Ethanol	J.T.Baker - Center Valley, USA
Ficoll / LSM 1077 Lymphocyte, steril	PAA – Pasching, Österreich
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA – Pasching, Österreich
PBS	Biochrom – Berlin, Deutschland
RPMI 1640	PAA – Pasching, Österreich
Trypanblau	Sigma-Aldrich – St. Louis, USA
Tween ^K 20 pure	Serva – Heidelberg, Deutschland

ELISA - Enzygnost®Anti-HBs II - Kit

anti-HBs II Mikrotitrationsplatte	Dade Behring – Marburg, Deutschland
anti-HBs II Conj	Dade Behring – Marburg, Deutschland
anti-HBs II Neg	Dade Behring – Marburg, Deutschland
anti-HBs II REF P	Dade Behring – Marburg, Deutschland
Waschlösung POD	Dade Behring – Marburg, Deutschland
Puffer/Substrat TMB	Dade Behring – Marburg, Deutschland
Chromogen TMB	Dade Behring – Marburg, Deutschland
Stopplösung POD	Dade Behring – Marburg, Deutschland

2.5. Methoden

2.5.1. Immunologische Nachweismethoden

Die entnommenen Serumproben dienten zur Hepatitis B-Antikörpertiterbestimmung mittels ELISA. Die präparierten Lymphozyten wurden mit Hilfe des ELISpots weiter untersucht.

2.5.1.1. ELISA

Der ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) ist ein immunologisches Nachweisverfahren, welches fast jedes lösliche Antigen mittels enzymatischer Farbreaktion quantifizieren kann.

Das Prinzip basiert dabei auf Interaktion zwischen dem nachzuweisenden Antigen und dem spezifischen Antikörper oder dem Antigen, welches mit einem Enzym markiert ist und über mehrere Zwischenschritte zu einem Farbumschlag führt. Dieser kann mit einem Photometer gemessen werden und dessen Intensität ist proportional zur Antikörperkonzentration in der Probe.

Erstmals wurde dieses Verfahren 1971 von den Europäern Peter Perlmann und Eva Engvall sowie Anton Schuurs und Bauke van Weemen beschrieben. Sie hatten damit eine sicherere Nachweismethode entwickelt, als die damals übliche Radioimmunoassay, die aufgrund der starken Strahlenbelastung ein erhebliches Gesundheitsrisiko darstellte (Engvall & Perlmann, 1971; Van Weemen & Schuurs, 1971).

Der ELISA wurde mit Hilfe des nicht automatischen Sandwich-Prinzips der Enzygot® anti-HBs II Einschrittassay durchgeführt. Als Festphase- und Konjugationsantigen wurde humanes HBsAg verwendet.

Alle Reagenzien und Proben wurden vor Testbeginn auf Raumtemperatur erwärmt und auf der Testplatte 20 ml Waschlösung POD mit entionisierten Wasser auf 400 ml verdünnt. In jedes Well der 96-Well-Platte wurden 25 µl des anti-HB Conj eingefüllt und unmittelbar nach Beendigung der Konjugatdosierung die Kontrollen und Proben hinzupipettiert. In die ersten vier Vertiefungen wurden je 100 µl anti-HBs II Neg, in eine Vertiefung 100 µl Anti-HBs II REF P, in die folgenden Vertiefungen 100 µl Probe und in die letzte nochmals 100 µl anti-HBs REF P pipettiert.

Die fertige Platte wurde mit Folie beklebt und umgehend in den Inkubator gestellt, wo sie für 60 Minuten bei 37 °C inkubierte. Im Anschluss wurde umgehend die Folie abgezogen, alle Vertiefungen ausgesaugt und viermal mit je 0,3 ml Waschlösung gespült. Sofort nach Beendigung der Waschschrte wurde in jede Vertiefung 100 µl Chromogene-Verbrauchslösung (1 ml Chromogen TMB mit 10 ml Puffer/Substrat TMB) gegeben und die Testplatte erneut mit einer Folie abgeklebt. Die Substratinkubation erfolgt für 30 Minuten unter lichtgeschützten Bedingungen bei Raumtemperatur. Nach Beendigung der Inkubation wurde in jede Vertiefung 100 µl Stopplösung POD zugegeben, um die Substratreaktion zu stoppen. Die photometrische Messung erfolgte innerhalb einer Stunde bei 450 nm. Als Referenzwellenlänge wurden 650 nm verwendet.

Die ermittelte Extinktion wurde mit Hilfe des Korrektur-Faktors korrigiert und unter Zuhilfenahme der Rechenwerte (laut Hersteller) zur Berechnung der Antikörperaktivität herangezogen.

Der Korrekturfaktor wird nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Korrekturfaktor} = \frac{\text{Nominalwert}}{\text{Extinktions-Mittelwert anti-HBs II REF P}}$$

Versuch 1: Nominalwert = 1,38

Versuch 2: Nominalwert = 1,4

Die Antikörperaktivität wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\log_{10} \text{ mU/l} = \alpha \times E^{\beta}$$

α / β = Rechenwerte laut Hersteller

Versuch 1: $\alpha = 4,7695$ $\beta = 0,111$

Versuch 2: $\alpha = 4,7537$ $\beta = 0,1124$

Die cut-off-Werte wurden, wie folgt, berechnet:

$$\text{cut-off} = E \text{ anti-HBs II Neg} + 0,08$$

Die Ermittlung der Antikörperaktivität erfolgte in zwei Messreihen.

2.5.1.2. ELISpot

Der ELISpot (Enzyme Linked Immuno Spot Technique) wurde erstmals 1983 von zwei Gruppen beschrieben und diente als alternatives immundiagnostisches Nachweisverfahren von *Mycobacterium tuberculosis* zum damals üblichen Tuberkulin-Hauttest (Czerkinsky et al., 1983; Sedgwick & Holt, 1983).

Das Testprinzip basiert auf der Ausschüttung von verschiedenen Zytokinen, vor allem IFN- γ , nach Antigen-Antikörper-Wechselwirkung. Dabei werden T-Lymphozyten *in vitro* durch das spezifische Antigen stimuliert und sezernieren bei vorhandenem Immungedächtnis IFN- γ . Dieses kann durch eine herkömmliche Sandwichtechnik auf einer Mikrotiterplatte als kleine Punkte sichtbar gemacht und computergestützt ausgezählt werden. Die Anzahl und Größe der Spots spiegeln die Aktivität der stimulierten T-Zellen wider und können somit eine Aussage zum Infektionsstatus der untersuchten Person geben.

Aus dem abgenommenen Heparinblut wurden die Lymphozyten - wie oben beschrieben - isoliert bzw. die eingefrorenen Proben aufgetaut.

Es wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte unter sterilen Bedingungen mit 30 μ l/Well 35%igem Ethanol beschichtet und im Anschluss dreimal mit 150 μ l/Well PBS gewaschen. Dann wurde der 1-D1K-Antikörper vorbereitet, indem er im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt wurde. Von dieser Antikörperlösung mussten 60 μ l pro Well auf die Platte pipettiert werden und anschließend für drei Stunden bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht inkubieren. Danach erfolgte das vorsichtige Ausschlagen der Mikrotiterplatten und dreimaliges Waschen mit 200 μ l/Well sterilem PBS. Um unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrocellulose zu blockieren, wurde die Platte mit 150 μ l/Well Zellkulturmedium (RPMI + 10%FKS) für mindestens drei Stunden bei 37°C inkubiert.

Es wurden 2×10^6 PBMC's pro Milliliter in RPMI + 10%FKS aufgenommen.

Die Blockierlösung wurde steril entfernt und 100 μ l/Well der Zellsuspension tröpfchenweise pipettiert. Nach 20minütiger Inkubation wurden je 100 μ l des Hepatitis B-Antigens in die vorgesehenen Wells zugegeben.

Als Negativkontrolle wurden von jedem Patienten Zellkulturen ohne Antigen (mit 100 μ l RPMI + 10%FKS) als Leerwert mitgeführt.

Zur Positivkontrolle wurde 100 µl/Well einer PHA-Lösung zugesetzt, welche aus einer Ausgangskonzentration von 5 µg/ml besteht.

Alle Ansätze wurden für jeden Patienten in Doppelbestimmung durchgeführt. Dabei wurden zwei Wells parallel mit dem gleichen Probenmaterial angesetzt. Die präparierte Platte wurde bei 37 °C im Inkubator mit 5 % CO₂ für 24 Stunden kultiviert. Anschließend erfolgte die 6-malige Waschung der geleerten Mikrotiterplatte mit je 200 µl Waschpuffer (PBS + 0,01%Tween).

Der biotinylierte anti-human IFN-γ 7-B6-1 monoklonale Antikörper wurde auf 1 µg/ml mit Verdünnungspuffer (steriles PBS/0,5 % BSA) verdünnt und in einer Menge von 60 µl je Well dazugegeben. Diese Platte inkubierte danach sofort für drei Stunden bei 37 °C im Brutschrank.

Nach der Inkubation wurde die Platte 6-mal mit 200 µl/Well Waschpuffer gewaschen und im Anschluss 100 µl/Well Streptavidin Alkalische Phosphatase zugesetzt (1:1000 in sterilem PBS verdünnt) und für 50 Minuten im Dunklen inkubiert. Durch dreifaches Waschen mit Waschpuffer und dreifaches Waschen mit PBS wurde das ungebundene Reagenz entfernt.

Mit 75 µl/Well Substrat BCIP/NBT wurden die Spots nach einer Inkubationszeit von 5 bis 10 Minuten in Dunkelheit sichtbar und die Reaktion mit Leitungswasser gestoppt. Die Polyesterolunterlage wurde nach dem Reaktionsstopp von der Platte entfernt und dann unter fließendem Wasser gründlich gewaschen. Nach Trocknung der Mikrotiterplatte konnte diese im AID Reader computerassistent ausgelesen werden.

2.5.2. Computerassistierte Auswertung

Die Auszählung der Spots in den einzelnen Wells erfolgte mit Hilfe des AID Readers.

Ein Spot muss mindestens 5 - 7 Pixel auf dem aufgenommenen Mikroskop-Rohbild groß sein, um als solcher gezählt zu werden. Außerdem lässt die computergestützte Analyse der Platten eine akkurate Aktivitätsbestimmung zu. Diese erfolgt durch Summierung der Spotflächen und kann dadurch zur Ergebnisfindung beitragen. Ein großer Vorteil des AID Readers ist die automatische Zählung der positiven Signale auf den einzelnen Wells. Die Bestimmung der Spotzahl lässt sich durch die Computerunterstützung zum einen erheblich schneller durchführen und bei schlechten oder übersättigten Platten besser auswerten als durch das

Auge des Untersuchers. Bei nicht korrekt durchgeführten ELISpot-Platten kann dies auch durch den Reader erkannt werden und als Fehlermeldung dem Benutzer als Hinweis dienen, eine eventuelle Wiederholung des Testes durchzuführen. Mit Hilfe dieses Verfahrens können auch Vertiefungen mit ungleicher Verteilung oder unterschiedlichen Spotformen effizient, sicher und schnell ausgezählt werden. Natürlich ist eine Mikrotiterplatte bzw. ein Well, welche sich nicht manuell auszählen lassen, auch nicht mittels des computerassistierten Verfahrens hundertprozentig richtig auswertbar. Aus diesem Grund ist sowohl für die manuelle als auch die automatisierte Bestimmung der Spots ein richtig durchgeführter ELISpot die Voraussetzung für ein sicheres Ergebnis.

2.5.3. Statistische Weiterverarbeitung

Die statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen SigmaStat 3.5 und SigmaPlot 12.3 (Systat Software – Chicago, USA) sowie MedCalc 10.2.0.0 (MedCalc Software - Ostend, Belgien).

Aus den gemessenen Spot-Werten (Doppelbestimmung von zwei parallel angesetzten Wells) im ELISpot wurden Mittelwerte gebildet und diese zur weiteren Auswertung benutzt. Dabei wurde das Verhältnis von Anzahl der Antigen-Spots zu denen des Leerwertes ins Verhältnis gesetzt. Der errechnete Quotient diente als Wert für die weitere statistische Auswertung.

Zum einen wurden mit Hilfe von SigmaStat 3.5 die Mittelwerte der einzelnen Antigene sowie die dazugehörigen Standardfehler (standard error of mean) ermittelt und miteinander durch den „Mann Whitney Rank Sum Test“ bzw. den „Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks“ verglichen. Außerdem erfolgte die Ermittlung der Sensitivität und Spezifität durch die ROC-Kurven-Analyse mit dem Programm MedCalc 10.2.0.0.

Die Diagramme wurden zum einen mit SigmaPlot 12.3, MedCalc 10.2.0.0 und zum anderen mit Microsoft Office 2010 (Microsoft – Redmond, USA) erstellt.

3. Ergebnisse

Es wurden von 90 Patienten Proben gewonnen, von denen 86 mittels ELISA auf deren Antikörpertiter untersucht und ausgewertet werden konnten. Außerdem erfolgte eine ELISpot-Analyse, um die zelluläre Komponente nach Hepatitis B-Impfung zu verifizieren.

3.1. Probandenkollektiv

Das Probandenkollektiv bestand aus 86 gesunden Personen im Alter zwischen 16 und 50 Jahren, von denen 49 % (n = 42) eine Impfung mit einem Hepatitis-Impfstoff erhalten hatten und 51 % (n = 44) der Patienten, die keine Immunisierung auf den Hepatitis B-Virus hatten (Tab. 1).

		Impfstatus		Anzahl
		geimpft	nicht geimpft	
Geschlecht	männlich	16	14	30
	weiblich	26	30	56
	Summe	42	44	86

Tabelle 1: Patientenkollektiv – Geschlechterverteilung und Impfstatus der 86 Patienten (30 männliche [35 %] und 56 weibliche Probanden [65 %], von denen 42 geimpft [49 %] und 44 nicht geimpft [51 %] waren)

Insgesamt waren es 35 % (n = 30) männlich und 65 % (n = 56) weibliche Probanden. Von den 56 weiblichen Patienten waren 46 % (n = 26) geimpft und 54 % (n = 30) nicht geimpft. Bei den 30 männlichen Probanden lag bei 53 % (n = 16) eine Impfung und bei 47 % (n = 14) keine Impfung vor.

Einschlusskriterien war neben einem Alter zwischen 16 und 50 Jahren die Bedingung, dass keine Immunsuppressiva in der Medikamentenanamnese angegeben worden und der allgemeine Gesundheitszustand des Patienten keine schwerwiegenden Begleiterkrankungen sowie keine Schwangerschaft und immunsupprimierenden Erkrankung (z. B. HIV-Infektion) aufwies.

Das Patientenalter verteilte sich, wie folgt: 9 % (n = 8) waren unter 20 Jahre alt, 36 % (n = 31) zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr, 22 % (n = 19) nicht älter als 40 Jahre und in der Gruppe über 40 Jahren befanden sich 33 % (n = 28) aller Probanden (Abb. 5a).

Per Anamnese und Kontrolle des Impfausweises wurde ermittelt, wie viele Impfungen die einzelnen Personen erhalten hatten. Bei 24 % (n = 10) der Personen lag eine Impfung vor, bei 7 % (n = 3) zwei Impfungen und eine komplett abgeschlossene Grundimmunisierung mit drei oder mehr Impfungen erfolgte bei 69 % (n = 29) der Geimpften. Bei der komplett abgeschlossenen Immunisierung erhielten insgesamt 55 % (n = 23) drei Impfungen und jeweils 7 % (n = 3) vier und fünf Impfungen (Abb. 5b).

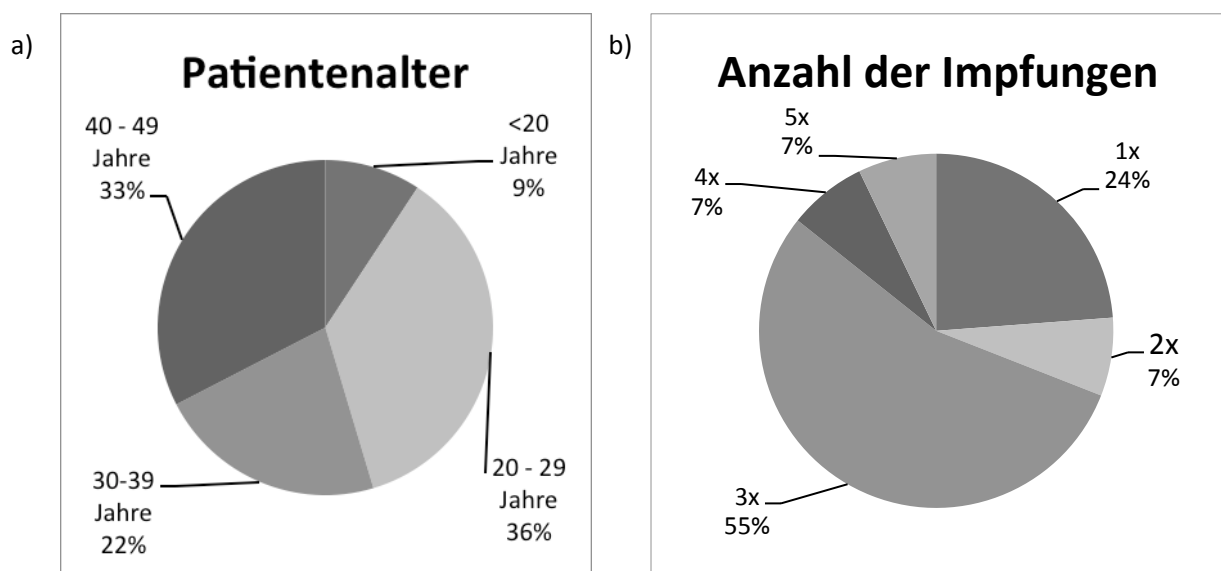


Abbildung 5a+b: Patientenkollektiv – a) Alter der Patienten und b) Anzahl der Impfungen, 8 (9 %) Personen jünger als 20 Jahre, 31 (36 %) nicht älter als 30 Jahre, 19 (22 %) zwischen 30 und 40 Jahren und 28 (33 %) zwischen 40 und 50 Jahren; 10 (24 %) Patienten erhielten eine Impfung, 3 (7 %) zwei Impfungen, 23 (55 %) Personen drei Impfungen, 3 erhielten jeweils vier (7 %) und fünf (7 %) Impfungen

Eine Immunisierung in den letzten fünf Jahren wurde bei 10 % (n = 4) der Personen durchgeführt. Bei 48 % (n = 20) lag die letzte durchgeführte Vakzinierung zwischen fünf und zehn Jahren und bei 21 % (n = 9) lagen mehr als zehn Jahre zwischen der Impfung und Abnahme des Probematerials. Der Abstand zur Impfung konnte bei 21 % (n = 9) der Patienten nicht schriftlich nachgewiesen werden, da keine Dokumentation diesbezüglich im Impfaus-

weis aufgeführt war. Diese Patienten wurden weiterhin in die Gruppe der Geimpften eingeteilt, da eine Immunisierung stattgefunden hatte (Abb. 6).

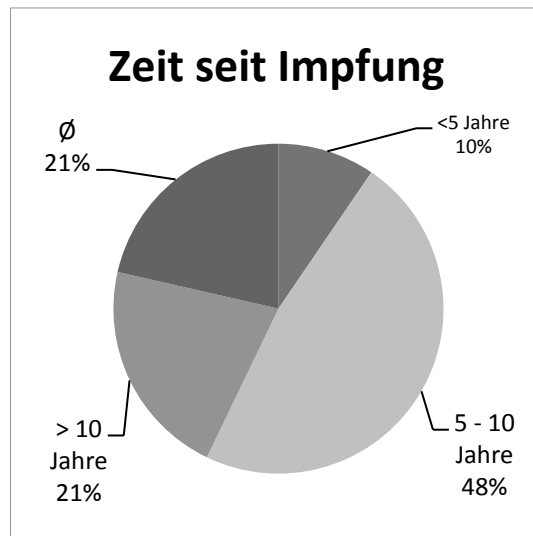


Abbildung 6: Patientenkollektiv – zurückliegende Zeit seit letzter Impfung, bei 4 (10 %) Patienten war die Impfung nicht älter als fünf Jahre, bei 20 (48 %) lag sie zwischen fünf und zehn Jahren, 9 (21 %) Patienten wurden vor mehr als zehn Jahren geimpft und bei 9 (21 %) Personen konnte das Datum nicht zurückverfolgt werden

3.2. ELISA

Mit Hilfe des ELISA wurde der anti-HBs-Titer der Probandenproben ermittelt. Es wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt und aus den ermittelten Extinktionen die Antikörperaktivität berechnet (siehe Kapitel 2.4.1.1.)

Zur genauen Berechnung wurde, wie oben beschrieben, jeweils für beide Testreihen ein Korrekturfaktor ermittelt.

Es konnte bei Versuchsreihe 1 ein Korrekturfaktor von 1,017699115 ($= 1,38 / 1,356$ [NominalwertV1 / E Anti-HBs II REF P V1]) ermittelt werden.

Bei der Versuchsreihe 2 wurde der Korrekturfaktor mit 1,111552203 ($= 1,4 / 1,2595$ [NominalwertV2 / E Anti-HBs II REF P V2]) berechnet.

Die cut-off-Werte wurden entsprechend der Anleitung berechnet und betrugen bei der ersten Versuchsreihe 7,381 U/l (= cut-off 1) und bei der zweiten Testreihe 7,912 U/l (= cut-off 2).

Im ELISA konnte bei 95,2 % der geimpften Personen ein positiver anti-HBs-Titer nachgewiesen werden (anti-HBs > cut-off). Eine Seroprotektivität (Titer > 10 U/l) zeigte sich bei 36 von den 42 geimpften Patienten (86 %).

Mit Hilfe der ROC-Kurven-Analyse wurden die ermittelten Antikörpertiter und der dazugehörige Impfstatus im nachfolgenden Diagramm dargestellt und die statistischen Werte errechnet. (Abb. 7)

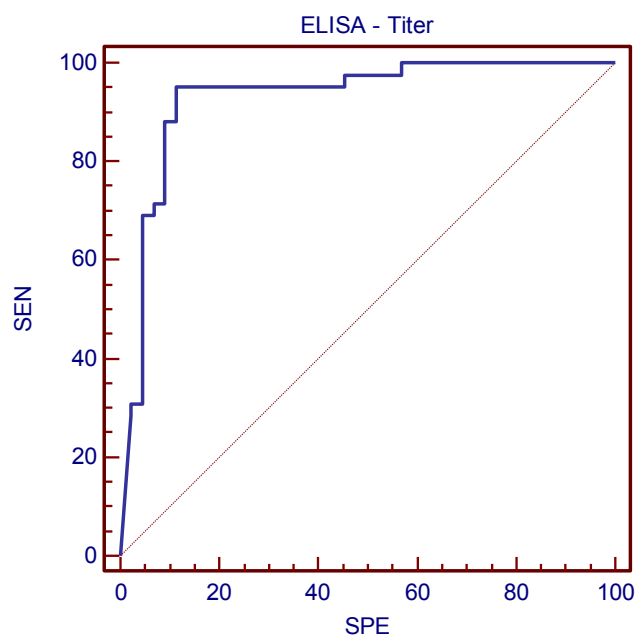


Abbildung 7: ROC-Kurven-Analyse des ELISA-Titers (n = 86)
Sensitivität (SEN); Spezifität (SPE); Bei Verwendung eines errechneten cut-off von 7,338 U/l ergab sich eine Sensitivität von 95,2 % und eine Spezifität von 88,6% ($p < 0,001$).

Anhand der ROC-Kurven-Analyse konnte bei den 86 mittels ELISA untersuchten Proben eine Sensitivität von 95,2 % und eine Spezifität von 88,6 % ermittelt werden. Es zeigte sich somit eine deutliche Abhängigkeit der Parameter „geimpft“ und „nicht geimpft“ beim Antikörpertiter ($p < 0,001$).

Die Area-under-the-curve betrug bei dieser Grafik 0,93 (Abb. 7).

Im Weiteren wurden die Antikörpertiter sowohl der geimpften als auch der nicht geimpften Patienten gegenüber gestellt und anhand der nachfolgenden Grafik dargestellt und verglichen. (Abb. 8)

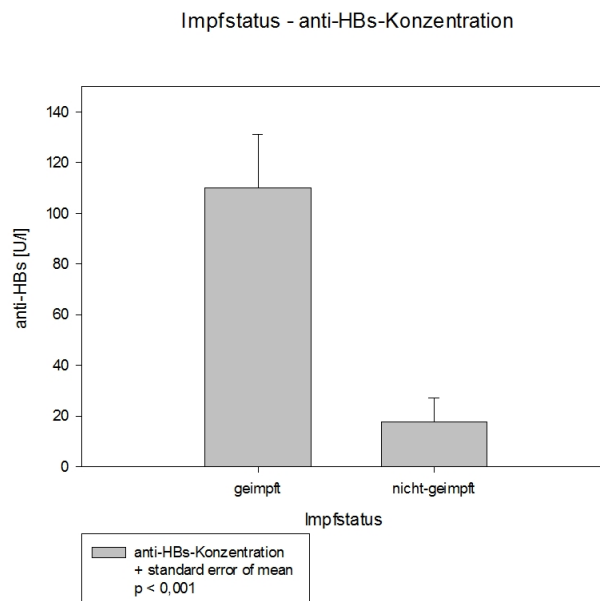


Abbildung 8: anti-HBs-Konzentration-Mittelwerte geimpfter (n = 42) vs. nicht geimpfter (n = 44) Patienten mit standard error of mean (Mittelwert: 109,9 U/l vs. 17,7 U/l; SEM: 21,1 vs. 9,5)

Die geimpften Probanden hatten im Mittel einen ELISA-Titer von 109,9 U/l (standard error of mean 21,1). Bei den nicht geimpften Patienten zeigte sich ein Mittelwert von 17,7 U/l (standard error of mean 9,5).

Die Vergleichsanalyse der ELISA-Titer der beiden Gruppen mittels t-Test ergab einen signifikanten Unterschied zwischen dem geimpften und dem nicht geimpften Kollektiv ($p < 0,001$).

Dies zeigt, dass eine Impfung mit einem erhöhten Antikörpertiter einhergeht und Personen, welche nicht geimpft wurden, keinen bzw. einen signifikant niedrigeren Titer aufwiesen.

Im ELISA wurden außerdem einige Proben analysiert, welche vermeintlich falsch positive bzw. falsch negative Ergebnisse im Sinne des Impfstatus und des dazugehörigen Antikörpertiters aufwiesen. Auf Grund der Charakteristika des verwendeten diagnostischen Tests ist davon auszugehen, dass die Patienten in diesem Fall keine korrekten Angaben zu Impfung bzw. Vorinfektion gemacht hatten.

Fünf Patienten, welche eine negative Impfanamnese besaßen, wurden als positiv ermittelt. Dies waren Patient 18 (AK-Titer = 52,22 U/l), Patient 22 (AK-Titer = 25,49 U/l), Patient 36 (AK-Titer = 418,48 U/l), Patient 44 (AK-Titer = 58,93 U/l) und Patient 76 (AK-Titer = 9,06 U/l).

Eine Untersuchung auf eine unerkannt abgelaufene Hepatitis B-Infektion war vom Studiendesign her nicht möglich, da die Proben anonymisiert wurden.

Zwei Patienten, die schon eine Impfung gegen Hepatitis B erhalten hatten, wurden mittels ELISA als negativ eingestuft. Dies waren zum einen Patient 24 (AK-Titer = 5,55 U/l) und Patient 66 (AK-Titer = 6,03 U/l). Jedoch lag bei Patient 66 die Dreifach-Impfung zwölf Jahre zurück und bei Patient 24 konnte das Datum der Impfung nicht mehr ermittelt werden.

Die geimpften Patienten wurden anhand ihres Alters in vier Gruppen eingeteilt und diese auf ihre Beziehung untereinander analysiert. In der Patientengruppe unter 20 Jahren befanden sich fünf Personen, zwischen 20 und 29 Jahren waren 24 Probanden, in der Altersgruppe von 30 bis 39 Jahren acht Patienten und in der Gruppe 40 Jahre und älter waren fünf zu untersuchende Proben (Abb. 9).

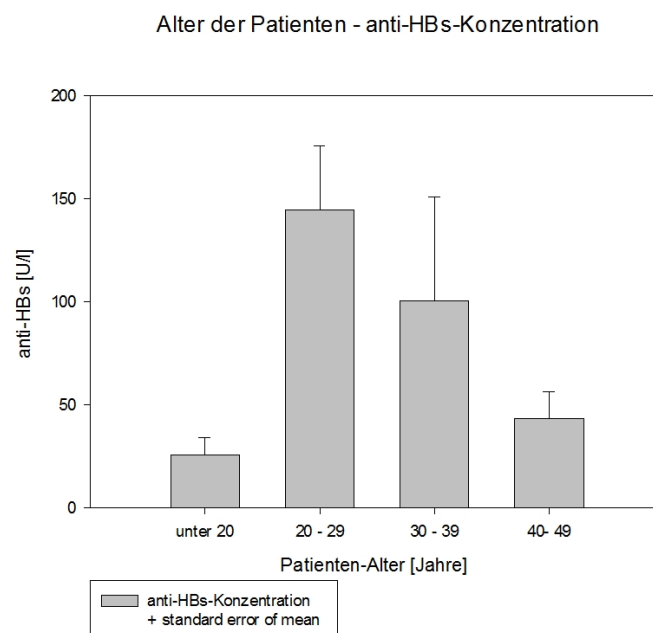


Abbildung 9: anti-HBs-Konzentration-Mittelwerte geimpfter Patienten mit standard error of mean im Altersgruppen-Vergleich: unter 20 Jahre (n = 5) 25,7 U/l (SEM=8,3), 20 - 29 Jahre (n = 24) 144,5 U/l (SEM=31,1), 30 - 39 Jahre (n = 8) 100,5 U/l (SEM=50,4), 40 - 49 Jahre (n = 5) 43,2 U/l (SEM=13,3)

Bei den Patienten unter 20 Jahren lag der Mittelwert des anti-HBs-Titers bei 25,7 U/l (standard error of mean 8,3), in der Gruppe der 20 bis 29 Jahre alten Patienten lag er bei 144,5 U/l (standard error of mean 31,1). Bei den Patienten unter 40 Jahren wurde ein Mittelwert von 100,5 U/l (standard error of mean 50,4) ermittelt. Der Durchschnittswert bei der ältesten Gruppe (40 – 49 Jahre) lag bei 43,2 U/l (standard error of mean 13,3). Ab einem Alter über 19 Jahren nahm die anti-HBs- Konzentration mit steigendem Alter ab.

Mit Hilfe des t-Testes wurden die einzelnen Gruppen und deren Verhältnis zueinander analysiert und es zeigte sich, dass zwischen keinem Kollektiv ein signifikanter Zusammenhang bestand ($1 > p > 0,09$).

Weiterhin wurde der Einfluss des Geschlechts auf den Antikörpertiter nach zurückliegender Hepatitis B-Impfung analysiert (Abb. 10).

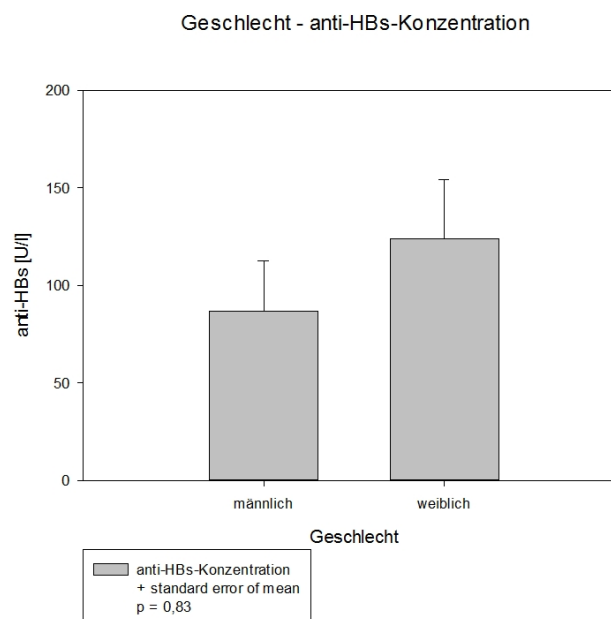


Abbildung 10: anti-HBs-Konzentration-Mittelwerte geimpfter Patienten mit standard error of mean männlich (n = 16) vs. weiblich (n = 26) (Geschlechtsvergleich: 86,9 U/l [SEM=25,5] vs 124,1 U/l [SEM=30,3])

Der Antikörpertiter in der männlichen Gruppe betrug im Mittel 86,9 U/l (standard error of mean 25,5) und in dem weiblichen Probandenkollektiv 124,1 U/l (standard error of mean 30,3).

Ein Zusammenhang von Geschlecht und Höhe des Antikörpertiters konnte nicht festgestellt werden ($p = 0,83$).

Aufgrund der unterschiedlichen Anzahl der Impfungen wurden auch hier sechs Gruppen gebildet und miteinander verglichen. Der Aufbau der Gruppen bestand aus einer Kohorte, welche Patienten beinhaltete, die keine ($n = 44$) Impfung erhalten hatten und fünf Kollektive mit je einer ($n = 10$) Impfung und zwei ($n = 3$), drei ($n = 23$), vier ($n = 3$) und fünf ($n = 3$) Impfungen. Im folgenden Diagramm sind die einzelnen Gruppen und deren ELISA-Titer-Mittelwert sowie der dazugehörige standard error of mean dargestellt (Abb. 11).

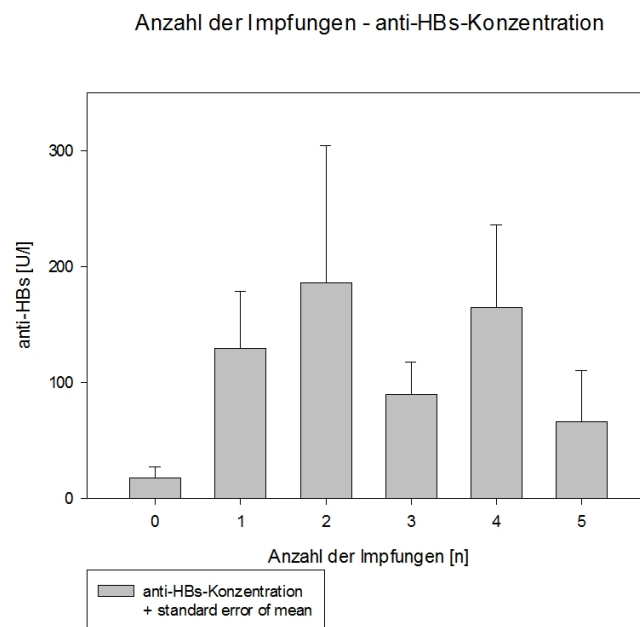


Abbildung 11: anti-HBs-Konzentration-Mittelwerte geimpfter und nicht geimpfter Patienten mit standard error of mean – Anzahl der Impfungen (0 [n = 44]: 17,7 U/l; 1 [n = 10]: 129,5 U/l; 2 [n = 3]: 186,3 U/l; 3 [n = 23]: 89,9 U/l, 4 [n = 3]: 164,7 U/l, 5 [n = 3]: 66,5 U/l) (SEM 9,5 vs. 49 vs. 118,1 vs. 27,4 vs. 71,7 vs. 43,7)

Die Mittelwerte in den Gruppen betrugen 17,7 U/l (bei keiner Impfung), 129,5 U/l (eine Impfung), 186,3 U/l (zwei Impfungen), 89,9 U/l (drei Impfungen), 164,7 U/l (vier Impfungen) und 66,5 U/l (fünf Impfungen) (standard error of mean 9,5 vs. 49 vs. 118,1 vs. 27,4 vs. 71,7 vs. 43,7).

Ein signifikanter Unterschied zeigte sich nur innerhalb des Vergleichs aller geimpften Gruppen zur nicht geimpften Kohorte ($p < 0,001$). Alle weiteren Signifikanzniveauberechnungen innerhalb der unterschiedlichen Impfanzahlen ergaben keinen signifikanten Zusammenhang ($0,88 > p > 0,17$).

Ein weiterer Vergleich beinhaltete das Verhältnis zwischen der Höhe des ELISA-Titers und der Zeit, die seit der letzten Impfung vergangen war. Dafür wurden vier Patientengruppen gebildet. Zum einen alle Patienten, welche eine Impfung in den letzten fünf Jahren ($n = 10$) erhalten hatten, Impfungen, welche vor zwischen fünf und zehn Jahren ($n = 17$) lagen, Impfungen, die länger als zehn Jahre ($n = 6$) zurückliegen und eine Gruppe, in der aufgrund unvollständiger Dokumentation im Impfausweis kein Datum ($n = 9$) ermittelt werden konnte (Abb. 12).

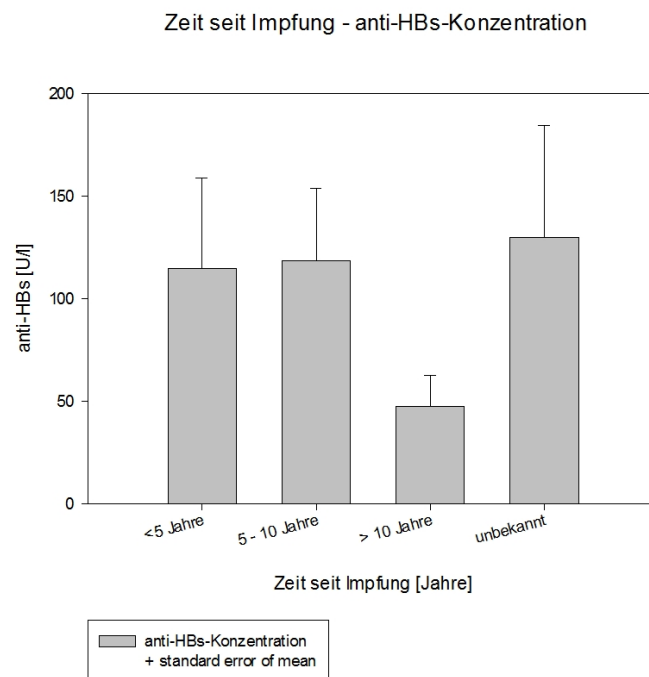


Abbildung 12: anti-HBs-Konzentration-Mittelwerte geimpfter Patienten mit standard error of mean - Zeit seit letzter Impfung (< 5 Jahre [$n = 10$]: 114,9 U/l; 5 – 10 Jahre [$n = 17$]: 118,5 U/l; > 10 Jahre [$n = 6$]: 47,4 U/l; unbekannt [$n = 9$]: 129,7 U/l) (SEM 44,2 vs. 35,4 vs. 15,2 vs. 54,8)

In der Patientengruppe, in der die Impfung unter fünf Jahren zurücklag, wurde ein Durchschnittswert von 114,9 U/l berechnet, 118,5 U/l bei allen Patienten, deren Impfung zwischen fünf und zehn Jahren zurücklag, und ein Wert von 47,4 U/l bei den Patienten, bei denen mehr

als zehn Jahre seit der letzten Impfung lagen. Bei den Patienten, bei denen der Zeitpunkt der letzten Impfung nicht mehr nachvollziehbar war, ergab sich eine durchschnittliche Antikörperaktivität von 129,7 U/l (SD 44,2 vs. 35,4 vs. 15,2 vs. 54,8).

Innerhalb der Jahresgruppen konnte mit Hilfe des t-Tests kein signifikanter Unterschied ermittelt werden ($1 > p > 0,38$).

Zur besseren Veranschaulichung des gesamten Patientenkollektives und der dazugehörigen Antikörpertiterwerte wurden diese in der folgenden Vierfeldertafel dargestellt (Tab. 2).

		ELISA-Titer		Summe
		positiv	negativ	
Impfstatus	geimpft	40	2	42
	nicht geimpft	5	39	44
	Summe	45	41	86

Tabelle 2: Vierfeldertafel – ELISA (anti-HBs-IgG) der 86 untersuchten Patienten, 40 von 42 geimpften wurden als positiv ermittelt und 39 von 44 nicht geimpften als negativ (5 unerwartet positive und 2 unerwartet negative Ergebnisse)

In der Vierfeldertafel lassen sich statistisch nochmals diese unerwartet negativen und positiven Proben aufzeigen. Es errechnet sich hierbei eine Sensitivität von 95 % und eine Spezifität von 89 % (PPV = 0,89; NPV = 0,95).

Zusammenfassend ist zum ELISA zu sagen, dass aufgrund der erhobenen Ergebnisse in dieser Arbeit die Höhe des anti-HBs-Titers nicht mit den Parametern Geschlecht, Alter des Patienten, Anzahl der Impfungen oder Abstand zur Impfung korrelierte. Als einzige relevante Abhängigkeit ist hierbei nur der Impfstatus zu sehen. Eine Immunisierung mit einem Hepatitis B-Impfstoff lässt sich somit sehr gut durch den ELISA nachweisen. Jedoch zeigen die Ergebnisse auch, dass einige Patienten (# 24, # 66) nach erfolgreich stattgefundener Impfung keinen anti-HBs-Titer hatten bzw. dass einige Personen (# 18, # 22, # 36, # 44, # 76) einen positiven Titer aufwiesen, obwohl keine Impfung dokumentiert war. Eine nachträgliche Überprüfung der Patienten, ob eventuell doch eine undokumentierte Impfung erfolgt oder eine unerkannte Hepatitis B-Infektion abgelaufen war, konnte aufgrund des Studiendesigns nicht erfolgen, da die Patienten verblindet waren und keine Rückstellproben aufbewahrt wurden.

Um den Impfstatus besser zu verifizieren, wurde im Zuge dieser Arbeit ein ELISpot-Verfahren ausgearbeitet und Proben auf die zelluläre Antwort des Immunsystems nach zurückliegender Hepatitis B-Impfung untersucht.

3.3. ELISpot-Vorversuche

Zu Beginn der ELISpot-Testreihen wurden Vorversuche durchgeführt, um eine möglichst genaue und sensitive sowie spezifische Etablierung der Methode zu gewährleisten.

Die SOP wurden im Labor bereits im Vorfeld festgelegt und validiert. Anhand dieser Daten wurden die Inkubationszeiten von zwölf und 24 Stunden verglichen, außerdem die Antigen-Konzentrationen und die Art der Mikrotiterplatte. Die Leerwert-korrigierten (Lw-korrigiert) Spotzahlen wurden in den Vorversuchen auch bei einem negativen Ergebnissen so belassen, um gegebenenfalls eine erhöhte Grundstimulation nicht zu verdecken. In allen darauf folgenden Untersuchungen wurden negative Ergebnisse vom positiven Wert abgezogen und damit auf den Wert 0 gesetzt.

Als Proben für diese Versuche standen zwei Buffycoats durchimmunisierter gesunder Spender aus der Blutspende zur Verfügung. Beide Proben wurden jeweils mit zwei verschiedenen Mikrotiterplatten (R7 und R8) untersucht und unterschiedlich lange inkubiert ($IZ_a = 12\text{ h}$ und $IZ_b = 24\text{ h}$) (Abb. 13 a + b).

Die zu untersuchenden Antigene waren zum einen das Antigen 1 in drei bzw. vier verschiedenen Konzentrationen (25 µg, 50 µg, 100 µg und 200 µg) und vier weitere Antigene (ESAT6, Tetanus, CMV, Diphtherie). Diese Antigene wurden benutzt, um eventuelle Auffälligkeiten zwischen den Mikrotiterplatten oder den Inkubationszeiten aufzudecken.

Im folgenden Diagramm sind die Spotzahlen der beiden oben erwähnten Buffycoats jeweils mit 12 h (Abb. 13 a) und 24 h (Abb. 13 b) Inkubationszeit auf den beiden Mikrotiterplatten R7 (= Platte 2) und der R8 (= Platte 1) gegenübergestellt.

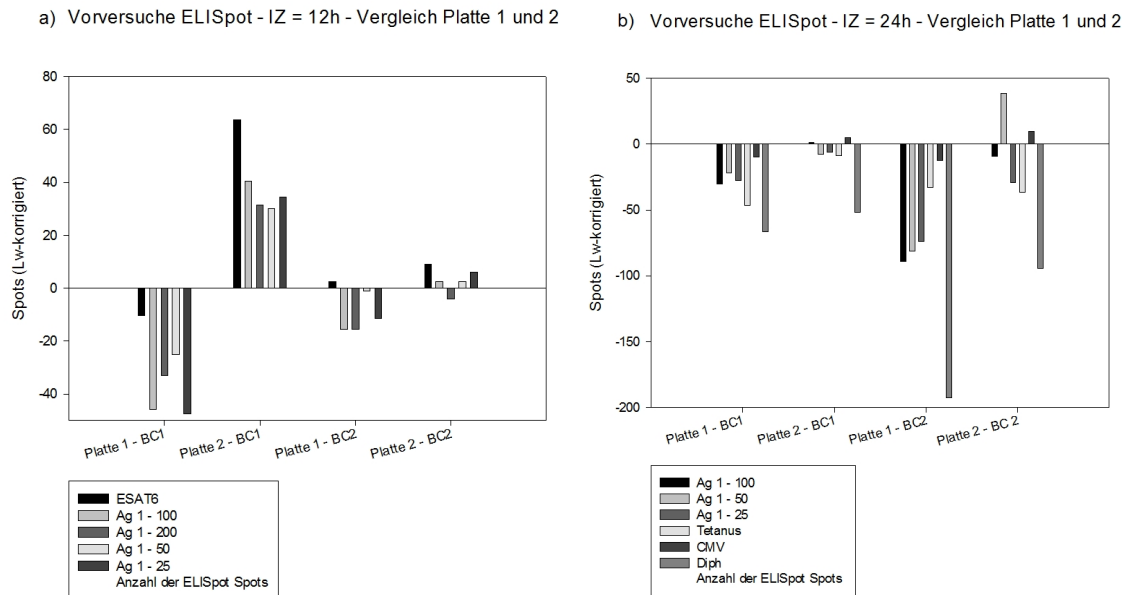


Abbildung 13 a + b: Vorversuche ELISpot – Anzahl der Spots – Vergleich Platte 1 + Platte 2
a) $IZ_a = 12\text{ h}$; **b)** $IZ_b = 24\text{ h}$, Hepatitis B-Ag 1-Konzentrationen (25 μg , 50 μg , 100 μg und 200 μg) sowie ESAT6, Tetanus-, CMV- und Diphtherie-Antigen

Der Vergleich der beiden Multititer-Platten (MutliScreen HTS-IP Filter Plates R7 und R8, Fa. Millipore) zeigten zwischen der R7- (= Platte 2) und der R8-Platte (=Platte 1) signifikante Unterschiede. Der Mittelwert der Spots betrug bei Buffy-Coat (BC) 1 – 12 h im Vergleich von Platte eins zu Platte zwei -32,4 Spots vs. 40 Spots. Bei Buffy-Coat (BC) 2 – 12 h betrug der Mittelwert bei der R8-Platte -8,2 Spots vs. 3,2 Spots bei der R7-Platte. In der Versuchsreihe von 24 h ergab sich bei Buffycoat (BC) 1 ein Verhältnis der Mittelwertspots von -33,8 vs. -11,4. In der Analyse von Buffycoat (BC) 2 konnten die Spotmittel mit -80,3 vs. -20,3 (Platte 1 vs. Platte 2) aufgezeigt werden. Im t-Test wurden für die einzelnen Buffcoats und den dazugehörigen Inkubationszeiten im Vergleich mit Platte 1 und Platte 2 folgende Werte errechnet:

BC 1 - 12 h $p < 0,001$ (R7 vs. R8), BC 1 - 24 h $p < 0,05$ (R7 vs. R8), BC 2 - 12 h $p < 0,02$ (R7 vs. R8), BC 2 - 24 h $p < 0,05$ (R7 vs. R8).

Es zeigte sich bei Platte 1 (R8) eine erhöhte Grundstimulation im Vergleich zur Platte 2 (R7). Aus diesem Grund wurde die Platte 2 präferiert und in allen folgenden Untersuchungen verwendet. Ein Vergleich der Antigenkonzentrationen erfolgte ebenso erst nach Festlegung der R7-Platte für das weitere Vorgehen.

Nach Definierung der Platte 2 (R7) als Standard erfolgte der Vergleich zwischen 12 h und 24 h Inkubationszeit mit zwei verschiedenen Buffycoats und drei verschiedenen Konzentrationen des Antigen 1 (25 µg, 50 µg und 100 µg).

In der nachfolgenden Grafik sind die ELISpot Spotwerte der beiden Buffycoats 1 und 2 mit drei verschiedenen Antigenkonzentrationen ($c_1 = 25 \mu\text{g}$, $c_2 = 50 \mu\text{g}$, $c_3 = 100 \mu\text{g}$) auf Platte 2 im Vergleich von 12 h und 24 h Inkubationszeit dargestellt (Abb. 14).

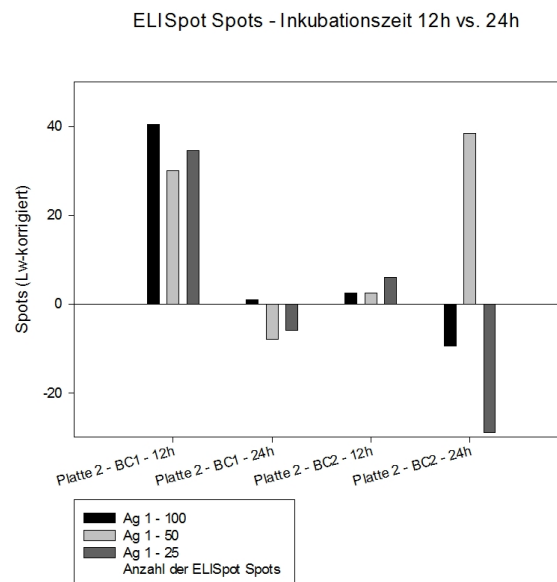


Abbildung 14: Vorversuche ELISpot – Anzahl der Spots – Vergleich Hepatitis B-Antigen 1-Konzentrationen ($c_1 = 25 \mu\text{g}$, $c_2 = 50 \mu\text{g}$, $c_3 = 100 \mu\text{g}$) bei zwei Buffycoats - $\text{IZ}_1 = 12 \text{ h}$, $\text{IZ}_2 = 24 \text{ h}$ für Platte zwei

Es zeigte sich beim Vergleich der Inkubationszeit von 12 h und 24 h bei Buffycoat 1 ein Mittelwert von 35 Spots (12 h) vs. -4,33 Spots (24 h) ($p < 0,001$). Bei der Analyse von Buffycoat 2 konnten die Spotmittelwerte von 3,67 Spots (12 h) vs. 0 Spots (24 h) ($p = 0,86$) ermittelt werden.

Es zeigte sich bei einer längeren Inkubationszeit (12 h vs. 24 h) eine höhere Grundstimulation vor allem bei Buffycoat 2, welche sich aufgrund des längeren Kontakts des Antigens mit dem Probenmaterial erklären lässt. Deshalb wurde für die späteren Versuche die Inkubationszeit von 12 h gewählt, um eine eventuelle Überstimulation der Leerwerte zu verhindern.

Um den ELISpot so effizient wie möglich zu gestalten, wurden außerdem verschiedene Konzentrationen des Antigens untersucht und miteinander verglichen. ($c_1 = 100 \mu\text{g}$, $c_2 = 50 \mu\text{g}$, $c_3 = 25 \mu\text{g}$). Der Mittelwert der Spots bei einer Konzentration von $25 \mu\text{g}$ betrug 1,34 Spots, bei $50 \mu\text{g}$ 15,75 Spots und bei $100 \mu\text{g}$ 8,63 Spots. Im direkten Vergleich mittels t-Test konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Antigenkonzentrationen ermittelt werden ($100 \mu\text{g}$ vs. $50 \mu\text{g}$ – $p = 0,66$, $100 \mu\text{g}$ vs. $25 \mu\text{g}$ – $p = 0,69$, $50 \mu\text{g}$ vs. $25 \mu\text{g}$ – $p = 0,44$).

Aufgrund der Ergebnisse im Antigenkonzentrationsvergleich und keiner signifikanten Unterscheidung innerhalb der Antigenmenge entschied man sich, die schon in den SOP aufgeführte Konzentration von $100 \mu\text{g}$ als Standard zu wählen.

In allen nachfolgenden Versuchen wurden folgende Standards definiert: eine R7-Mikrotiterplatte (Platte 2) bei 12 h Inkubationszeit mit einer Antigenkonzentration von $100 \mu\text{g}$ zur T-Zellstimulierung.

3.4. ELISpot

Mit Hilfe des ELISpot wurden die gewonnenen Proben der geimpften und nicht geimpften Probanden auf das Vorhandensein von spot-bildenden Zellen (SFC) nach Stimulierung mit drei verschiedenen HBs-Antigenpräparationen untersucht und mit den ermittelten Daten des ELISA verglichen.

Antigen 1 war ein rekombinantes Hepatitis B surface Antigen, adw-Subtyp, Quelle: Pichia Pastoris, Hersteller: ProSpec-Tany Technogene (ProSpec) – Israel.

Antigen 2 war ein rekombinantes Hepatitis B surface Antigen, adw-Subtyp, Quelle: Pichia Pastoris, Hersteller: BIOTREND Chemikalien GmbH Köln – Deutschland.

Antigen 3 war ein rekombinantes Hepatitis B surface Antigen, adr-Subtyp, Quelle: Saccharomyces cerevisiae, Hersteller: Ibt - immunological and biochemical testsystems GmbH – Deutschland.

Antigen 1 und Antigen 2 waren vom adw-Subtyp und Antigen 3 besitzt eine adr-Determinante. Wie in der Einleitung beschrieben, befindet sich auf dem HBsAg-Abschnitt bei allen Subtypen eine konstante a-Determinante und zwei Subtyp-Determinanten (siehe Kapitel 1.4.).

Das Antigen 1 wurde zur Analyse von 74 Patienten benutzt. 58 Proben konnten in die Auswertung mit einbezogen werden und 50 % waren geimpft ($n = 29$). Mittels des Antigen 2 wurden 36 Patienten untersucht, 26 davon konnten eingeschlossen werden (62 % geimpft, $n = 16$) und bei elf Patienten wurde der ELISpot mit dem Antigen 3 durchgeführt, von denen zehn Proben zur weiteren Berechnung genommen werden konnten (30 % geimpft, $n = 3$).

Parallel zu den Einzeltestungen wurden einige Patientenproben mittels zwei Antigenen untersucht. Der ELISpot wurde bei neun Patienten mit Antigen 1 und Antigen 3 durchgeführt; bei 15 Patienten mittels Antigen 1 und Antigen 2. Jeweils nur ein Antigen wurden bei der Untersuchung von 34 (Antigen 1), 11 Proben (Antigen 2) und 1 Probe (Antigen 3) verwendet.

Die Auswertung des ELISpots erfolgte durch die Bestimmung der Leerwert-korrigierten Anzahl der spot-bildenden Zellen bei Stimulation mit dem Hepatitis B-Antigen. Lag die Spotzahl bei Antigenstimulation unter der Leerwertkontrolle, wurde das Ergebnis als negativ ($n = 0$) bewertet.

Untersuchungen, die nicht den internen Qualitätskriterien entsprachen, konnten nicht verwendet werden. In die Auswertung wurden nur Werte mit einbezogen, welche in der Doppelbestimmung eine Abweichung von weniger als 50 % aufwiesen. Aus diesem Grund fielen folgende Patienten heraus: die Bestimmung mit Antigen 1 die Patienten 1, 3, 12, 25, 35, 45, 46 und 69; Antigen 2 die Patienten 32, 35, 36, 46 und 63 sowie bei Antigen 3 der Patient 21. Bei zehn ELISpot-Versuchen kam es zu einer ungenügenden positiv Reaktion ($PHA < 100$ Spots bzw. $Lw > PHA$). Dies traf für die Patienten 40, 43, 44, 46, 50, 54, 80, 83, 89 und 90 zu.

Mithilfe der ROC-Kurven-Analyse wurde der cut-off-Wert bestimmt und im weiteren Vorgehen als Grenzwert zwischen positiven und negativen Ergebnissen festgelegt (Abb. 15).

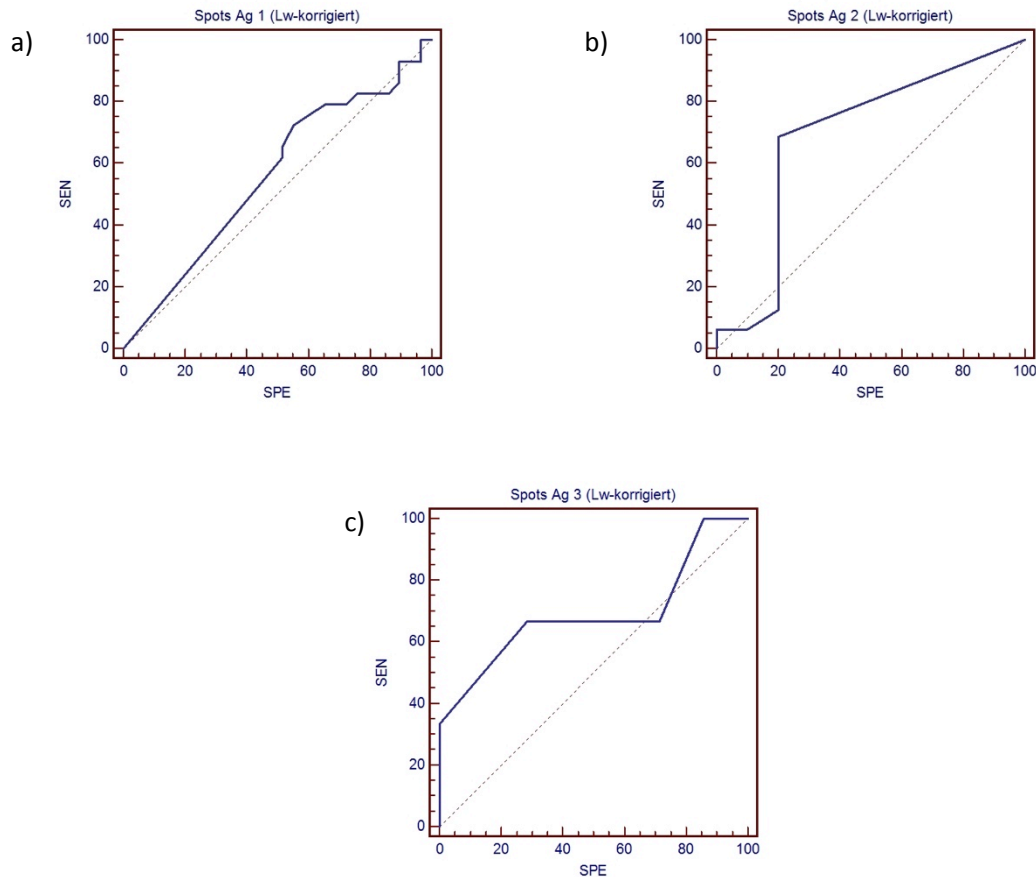


Abbildung 15 a - c: ROC-Kurven-Analyse der Leerwert-korrigierten Spots – **a)** Antigen 1 (Sensitivität – Spezifität) – bei Verwendung eines cut-off von ≥ 1 ergab sich eine Sensitivität von 72,4 % und eine Spezifität von 44,8% ($p = 0,44$) ($n = 58$) – **b)** Antigen 2 (Sensitivität – Spezifität) – bei Verwendung eines cut-off von > 0 ergab sich eine Sensitivität von 68,7 % und eine Spezifität von 80 % ($p = 0,07$) ($n = 26$) – **c)** Antigen 3 (Sensitivität – Spezifität) – bei Verwendung eines cut-off von $\geq 0,5$ ergab sich eine Sensitivität von 66,7 % und eine Spezifität von 71,4 % ($p = 0,29$) ($n = 10$)

In der ROC-Kurven-Analyse von Antigen 1 wurde ein cut-off von ≥ 1 errechnet mit einer Sensitivität von 72,4 % und einer Spezifität von 44,8 % ($p = 0,44$) (Abb. 15 a).

Für Antigen 2 wurde ein cut-off von > 0 , eine Sensitivität von 68,7 % und eine Spezifität von 80 % ermittelt ($p = 0,07$) (Abb. 15 b).

Die ROC-Kurven-Analyse bei Antigen 3 ergab einen cut-off $\geq 0,5$, eine Sensitivität von 66,7 % und eine Spezifität von 71,4 % ($p = 0,29$) (Abb. 15 c).

Aufgrund dieser Berechnungen wurde der cut-off für alle folgenden Auswertungen bei ≥ 1 festgelegt und somit die Proben als positiv gewertet, wenn das Leerwert-korrigierte ELISpot-Ergebnis ≥ 1 war.

Im ELISpot wurde die Anzahl der spot-bildenden Zellen (SFC) ermittelt und es zeigte sich, dass es bei 43 von 94 untersuchten Patientenproben zu einer positiven Ausschüttung von IFN- γ nach Stimulation mit HBsAg kam. Davon waren 51,2 % ($n = 22$) geimpft. Von allen geimpften Personen zeigten 45,8 % (22 von 48) eine positive Reaktion im ELISpot und 45,7 % (21 von 46) der nicht geimpften Patienten wiesen SFC auf.

Die Spotzahlen wurden für das jeweilige Antigen (Antigen 1, 2 und 3) im nachfolgenden Säulendiagramm dargestellt und nach geimpft und nicht geimpft unterteilt (Abb. 16).

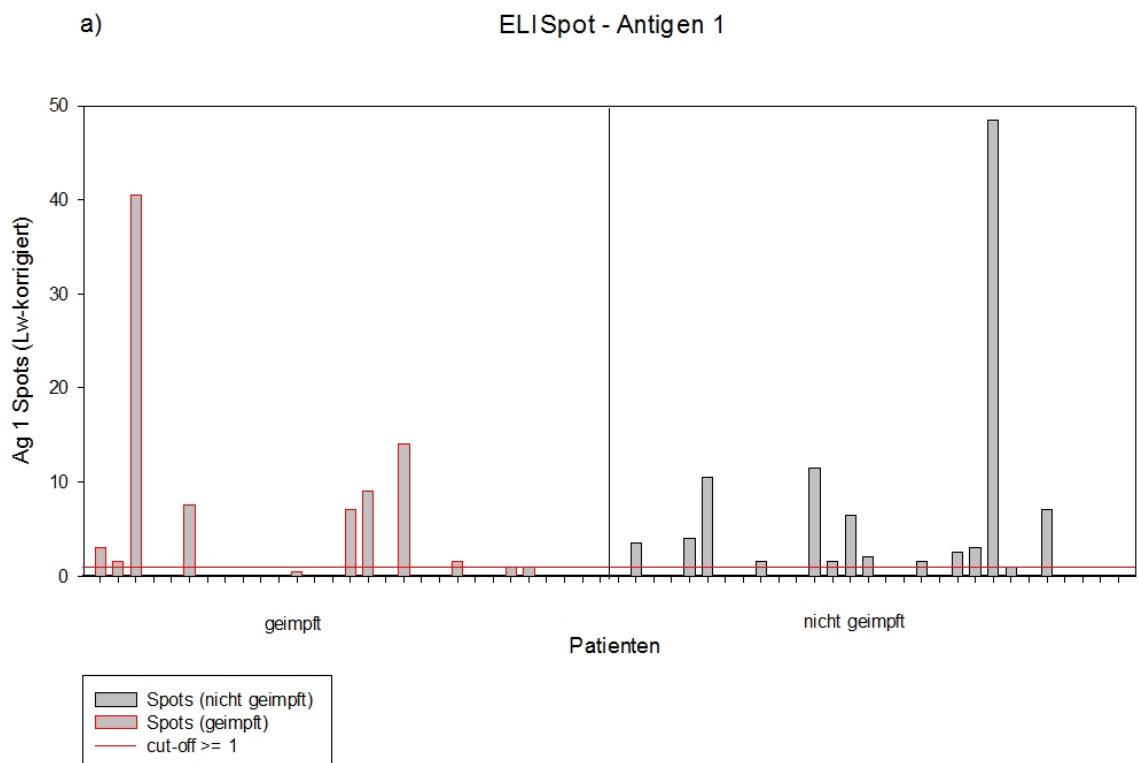


Abbildung 16 a: ELISpot – Leerwert-korrigierte Spots (X-Achse: 1 Strich = 1 Patient, geimpft, nicht geimpft) – Antigen 1 – bei einem cut-off von 1 (rot: geimpfte Patienten, grau: nicht geimpft) (Range: $0 < \text{Spots} < 48,5$) ($n = 58$, geimpft = 29, nicht geimpft = 29)

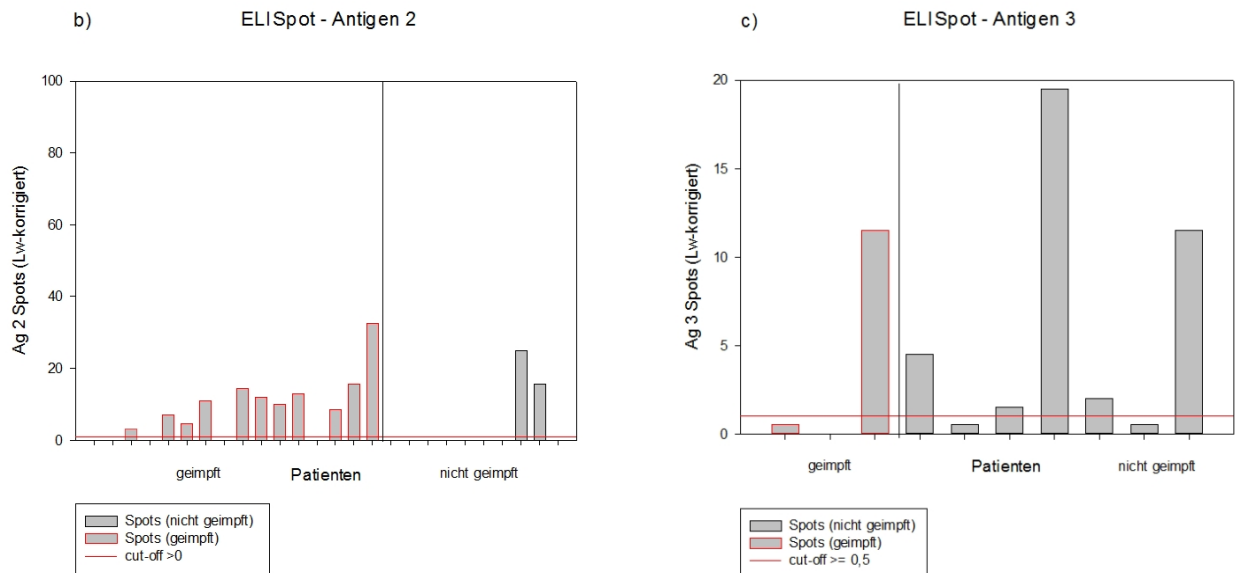


Abbildung 16 b + c: ELISpot – Leerwert-korrigierte Spots (X-Achse: 1 Strich = 1 Patient, geimpft, nicht geimpft)

b) Antigen 2 – bei einem cut-off von 1 (rot: geimpfte Patienten, grau: nicht geimpft) (Range: $0 < \text{Spots} < 32,5$) ($n = 26$, geimpft = 16, nicht geimpft = 10)

c) Antigen 3 – bei einem cut-off von 1 (rot: geimpfte Patienten, grau: nicht geimpft) (Range: $0 < \text{Spots} < 19,5$) ($n = 10$, geimpft = 3, nicht geimpft = 7)

Bei der Untersuchung mit Antigen 1 wurden 24 Patienten als positiv ermittelt, wovon 41,7 % ($n = 10$) geimpft waren. Der Mittelwert der 31 geimpften Patienten lag bei 2,98 (standard error of mean 1,48) ($1,0 < \text{Spots Ag 1}_{\text{geimpft}} < 40,5$). Im Kollektiv der nicht geimpften Personen ergab sich ein Mittelwert von 3,6 Spots (standard error of mean 1,71) ($0 < \text{Spots Ag 1}_{\text{nicht geimpft}} < 48,5$)

Bei allen 58 Patienten, die mit Antigen 1 untersucht wurden, lag der Mittelwert bei 3,29 (Range $0 < \text{Spots Ag 1} < 48,5$) bei einem standard error of mean von 1,12 (Abb. 16 a).

Mittels dem Antigen 2 wurde 13 Patienten als positiv ermittelt, von denen 84,6 % ($n = 11$) geimpft waren. Bei den geimpften Patienten lag der Mittelwert bei 8,22 (standard error of mean 2,15) ($0 < \text{Spots Ag 2}_{\text{geimpft}} < 32,5$). Die nicht geimpften Patienten hatten einen Mittelwert von 4,05 Spots (standard error of mean 2,79) ($0 < \text{Spots Ag 2}_{\text{nicht geimpft}} < 25$).

Insgesamt betrug der Mittelwert aller mit Antigen 2 getesteten Patienten 6,62 (Range $0 < \text{Spots Ag 2} < 32,5$) mit einem standard error of mean von 1,72 (Abb. 16 b).

Bei den zehn Patienten, die mittels Antigen 3 untersucht wurden, waren laut ELISpot sechs positiv, von denen 16,7 % ($n = 1$) eine positive Impfanamnese aufwiesen. Der Mittelwert der geimpften Probanden lag bei vier Spots (standard error of mean 3,75) ($0 < \text{Spots Ag 3}_{\text{geimpft}} < 11,5$). Bei dem nicht geimpften Kollektiv konnte ein Mittelwert von 5,7 Spots (standard error of mean 2,72) ($0,5 < \text{Spots Ag 3}_{\text{nicht geimpft}} < 19$).

Bei allen mit Antigen 3 getesteten Proben wurde ein Mittelwert von 5,2 (Range $0 < \text{Spots} < 19,5$) mit einem standard error of mean von 2,11 errechnet (Abb. 16 c).

Zur besseren Visualisierung der Ergebnisse im ELISpot wurde die Boxplot-Darstellung der einzelnen Antigene mit dazugehörigen Impfstatus genutzt. Die einzelnen Spots zu den dazugehörigen Antigenen wurden in der Gesamtheit sowie aller geimpfter und nicht geimpfter Patienten visualisiert (Abb. 17).

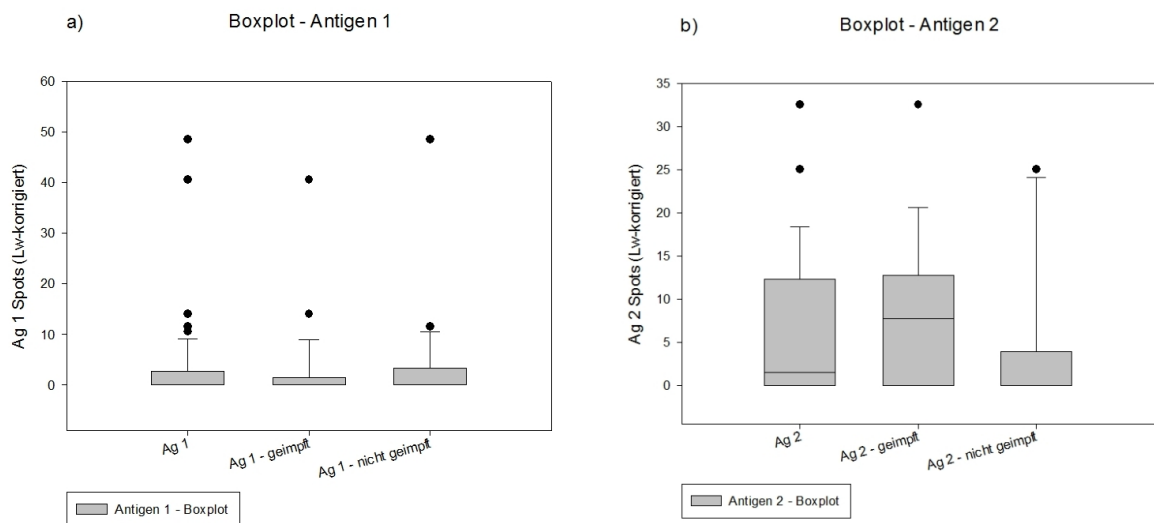


Abbildung 17 a + b: Boxplot Antigenspots – **a)** Antigen 1 – alle Patienten vs. geimpfte vs. nicht geimpfte ($\text{Box}_{\text{alle}}: 0 < 0 < 2,7$; $\text{Antenne}_{\text{alle}}: 9,2$; $\text{Box}_{\text{geimpft}}: 0 < 0 < 1,6$; $\text{Antenne}_{\text{geimpft}}: 9,1$; $\text{Box}_{\text{nicht geimpft}}: 0 < 0 < 3,4$; $\text{Antenne}_{\text{nicht geimpft}}: 10,5$) ($n = 58$, geimpft = 29, nicht geimpft = 29) – **b)** Antigen 2 – alle Patienten vs. geimpfte vs. nicht geimpfte ($\text{Box}_{\text{alle}}: 0 < 1,5 < 12,3$; $\text{Antenne}_{\text{alle}}: 18,3$; $\text{Box}_{\text{geimpft}}: 0 < 7,8 < 12,8$; $\text{Antenne}_{\text{geimpft}}: 20,6$; $\text{Box}_{\text{nicht geimpft}}: 0 < 0 < 3,95$; $\text{Antenne}_{\text{nicht geimpft}}: 24,1$) ($n = 26$, geimpft = 16, nicht geimpft = 10)

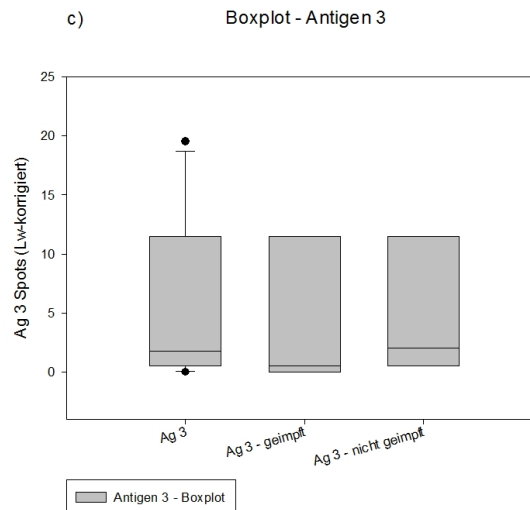


Abbildung 17 c: Boxplot Antigenspots – Antigen 3 – alle Patienten vs. geimpfte vs. nicht geimpfte ($\text{Box}_{\text{alle}}: 0,5 < 1,8 < 11,5$; $\text{Antennen}_{\text{alle}}: 0 / 18,7$; $\text{Box}_{\text{geimpft}}: 0 < 0,5 < 11,5$; $\text{Box}_{\text{nicht-geimpft}}: 0,5 < 2 < 11,5$) ($n = 10$, $\text{geimpft} = 3$, $\text{nicht geimpft} = 7$)

Bei Antigen 1 wurde für das gesamte Patientenkollektiv ein Median von 0 (50 % KI 0 – 2,63) berechnet. Die Analyse des Boxplots bei den geimpften Probanden im ELISpot des Antigen 1 ergab einen Median von 0 (50 % KI 0 - 1,5) und bei den nicht geimpften Personen einen Median von 0 (50 % KI 0 – 3,25) ($p = 0,4$) (Abb. 17 a).

Die Boxplot-Analyse bei Antigen 2 ergab für alle Messwerte einen Median von 1,5 (50 % KI 0 - 12,25). Die geimpften Patienten hatten im Mittel einen Median von 7,75 (50 % KI 0 – 12,75) und die nicht geimpften einen Wert von 0 (50 % KI 0 – 3,88) ($p = 0,09$) (Abb. 17 b).

Die Ermittlung der Medianwerte bei Antigen 3 ergaben bei der Gesamtheit einen Wert von 1,75 (50 % KI 0,5 - 11,5) Patienten, welche eine Impfung erhielten, hatten einen Median von 0,5 (50 % KI 0 - 11,5) und bei Patienten ohne positive Impfanamnese wurde der Zentralwert mit 2 (50 % KI 0,5 - 11,5) berechnet ($p = 0,38$) (Abb. 17 c).

Ein weiterer Vergleich erfolgte zwischen den einzelnen Gruppen, welche mit dem gleichen Antigen getestet wurden. Es wurden dabei die geimpften und nicht geimpften Patienten untersucht und die Mittelwerte mit dem dazugehörigen standard error of mean im folgenden Säulendiagramm dargestellt (Abb. 18).

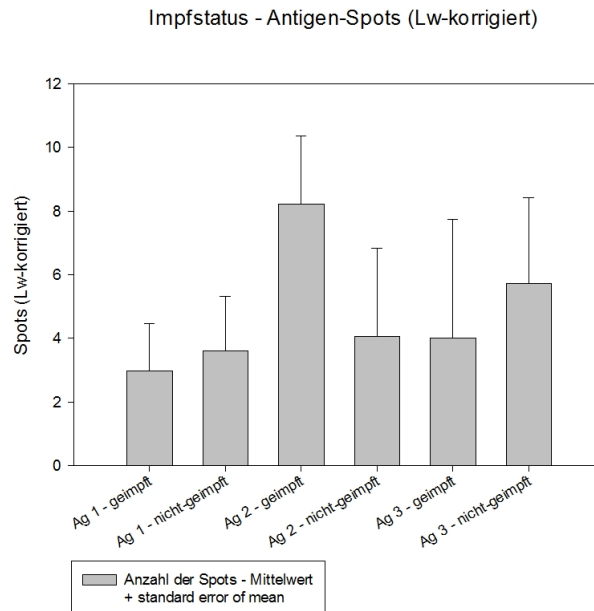


Abbildung 18: ELISpot – Vergleich der Mittelwerte des Leerwert-korrigierten Spots mit standard error of mean und dem dazugehörigen Impfstatus (geimpft vs. nicht geimpft) (Antigen 1 geimpft [n = 29] 2,98 [SEM=1,48] – Antigen 1 nicht geimpft [n = 29] 3,6 [SEM=1,71], Antigen 2 geimpft [n = 16] 8,22 [SEM=2,15] – Antigen 2 nicht geimpft [n = 10] 4,05 [SEM=2,79], Antigen 3 geimpft [n = 3] 4 [SEM=3,75] – Antigen 3 nicht geimpft [n = 7] 5,71 [SEM=2,72])

Antigen 1 zeigte im Mittel eine Spotzahl bei den geimpften vs. den nicht geimpften Patienten von 2,98 vs. 3,6 (standard error of mean 1,48 vs. 1,71).

Bei Antigen 2 wurde eine Spotzahl von 8,22 vs. 4,05 (standard error of mean 2,15 vs. 2,79) bei den geimpften vs. den nicht geimpften Patienten errechnet.

Eine Spotzahl von 4 vs. 5,71 (standard error of mean 3,75 vs. 2,72) zeigte sich bei Antigen 3 zwischen den geimpften und nicht geimpften Patienten dieser Gruppe.

Die t-Test-Bestimmung zwischen den geimpften und nicht geimpften Personen ergab bei Antigen 1: $p = 0,4$; bei Antigen 2: $p = 0,09$; bei Antigen 3: $p = 0,38$ und bei Antigen 1 – 3: $p = 0,72$ (Abb. 19). Es zeigte sich also, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den geimpften und nicht geimpften Probandengruppen besteht.

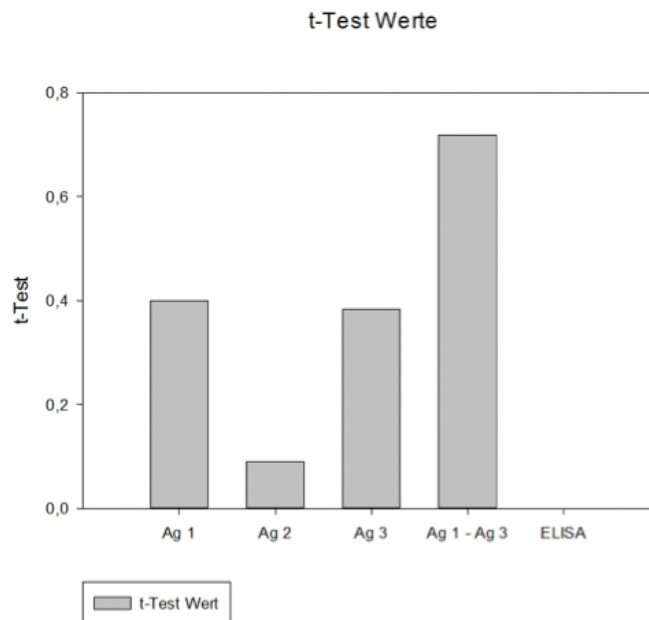


Abbildung 19: t-Test Werte geimpft vs. nicht geimpft - Antigen 1: $p = 0,4$; Antigen 2: $p = 0,09$; Antigen 3: $p = 0,38$; Antigen 1 - Antigen 3: $p = 0,72$ und ELISA: $p < 0,001$

Mit Hilfe der ROC-Kurven-Analyse wurde die „Area under the curve“ (AUC) berechnet und entsprechend ihrer Werte im Vergleich aller getesteten Antigene und dem ELISA im Diagramm veranschaulicht (Abb. 20).

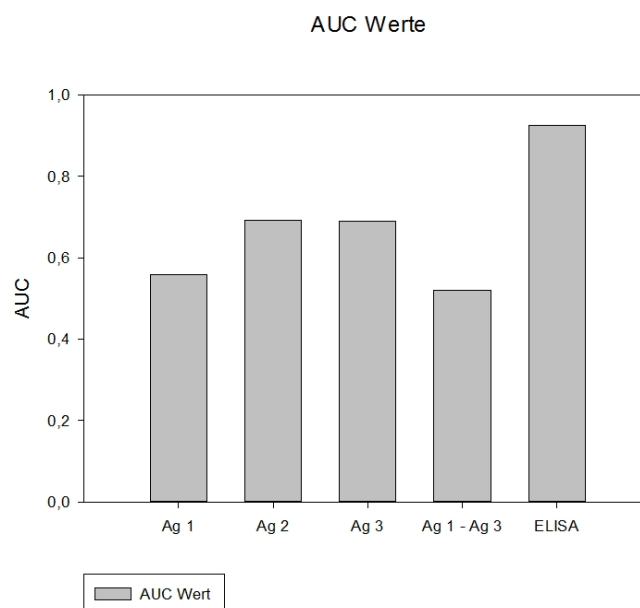


Abbildung 20: Area-under-the-curve - Antigen 1: AUC = 0,56; Antigen 2: AUC = 0,69; Antigen 3: AUC = 0,69; Antigen 1 - Antigen 3: AUC = 0,52 und ELISA: AUC = 0,93

Die Berechnung der Area under the curve ergab bei Antigen 1 eine AUC von 0,56, bei Antigen 2 eine AUC = 0,69, Antigen 3 eine AUC = 0,69, bei allen Antigenen eine AUC = 0,52 und im ELISA betrug die AUC = 0,93.

Parallel zu den Einzelbestimmungen der Spotzahlen wurden bei 15 Patienten der ELISpot mit dem Antigen 1 und Antigen 2 durchgeführt. Außerdem erfolgte bei neun Patienten die ELISpot-Analyse mittels Antigen 1 und Antigen 3 (Abb. 21).

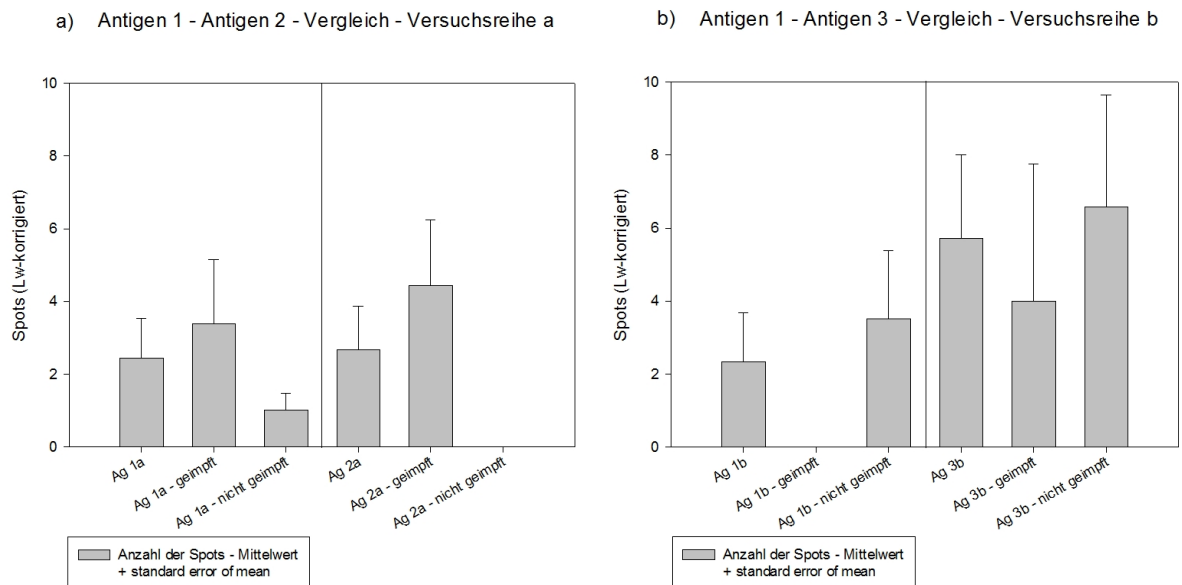


Abbildung 21 a + b: Vergleich Mittelwerte-ELISpot Versuchsreihe a und b –
a) Versuchsreihe a: Antigen 1a vs. Antigen 2a (Mittelwert: alle [n = 15]: 2,43 [SEM=1,09] vs. 2,67 [SEM=1, 2], geimpft [n = 9]: 3,39 [SEM=1,76] vs. 4,44 [SEM=1,79], nicht geimpft [n = 6]: 1 [SEM=0,47] vs. 0 [SEM=0])
b) Versuchsreihe b: Antigen 1b vs. Antigen 3b (Mittelwert: [alle n = 9]: 2,33 [SEM=1,34] vs. 5,72 [SEM=2,29], geimpft [n = 3]: 0 [SEM=0] vs. 4 [SEM=3,75], nicht geimpft [n = 6]: 5 [SEM=1,88] vs. 6,58 [SEM=3,05])

Bei dem Vergleich von allen Proben, die mit Antigen 1 und Antigen 2 in Versuchsreihe a untersucht wurden, ergab sich ein p-Wert von 0,76 (t-Test). Der Mittelwert von Antigen 1 betrug 2,43 Spots (standard error of mean 1,09) und beim Antigen 2 betrug er 2,67 Spots (standard error of mean 1, 2). Zwischen Antigen 1a geimpft und Antigen 2a geimpft ergab der t-Test einen p-Wert von 0,67 (Mittelwert: 3,39 [SEM=1,76] vs. 4,44 [SEM=1,79]). Beim

Vergleich von Antigen 1a nicht geimpft und Antigen 2a nicht geimpft konnte $p = 0,18$ ermittelt werden (Mittelwert: 1 [SEM=0,47] vs. 0 [SEM=0] [Abb. 21a]).

Die Vergleichsanalyse mit Hilfe des t-Tests bei Versuchsreihe 2 (Antigen 1 vs. Antigen 3) ergab beim Vergleich aller getesteten Proben einen p-Wert von 0,11. Der Mittelwert des Antigen 1 betrug 2,33 (standard error of mean 1,34) und 5,72 beim Antigen 3 (standard error of mean 2,29). Im Kollektiv der geimpften Patienten zwischen Antigen 1b und Antigen 3b wurde $p = 0,35$ (Mittelwert: 0 [SEM=0] vs. 4 [SEM=3,75]) und zwischen den nicht geimpften Proben Antigen 1b vs. Antigen 3b $p = 0,31$ errechnet werden (Mittelwert: 5 [SEM=1,88] vs. 6,58 [SEM=3,05]) (Abb. 21 b).

Aufgrund dieser Berechnungen wurden Antigen 1, 2 und 3 zusammengefasst und zur weiteren Analyse gemeinsam betrachtet.

Zur Ermittlung der Sensitivität, Spezifität sowie positiver und negativer prädiktiver Werte wurden die Zahlenwerte der Ergebnisse aus dem ELISpot und den dazugehörigen vorher ermittelten Impfstatus in einer Vierfeldertafel dargestellt (Tab. 3).

		ELISpot Ag 1, Ag 2 + Ag 3		Summe
		positiv	negativ	
Impfstatus	geimpft	22	26	48
	nicht geimpft	21	25	46
	Summe	43	51	94

Tabelle 3: Vierfeldertafel – aller Antigene (Leerwert-korrigierte Spots) der 94 untersuchten Patienten mit Antigen 1 - 3, 22 von 48 geimpften Patienten wurden als positiv ermittelt und 25 von 46 nicht geimpften als negativ (21 vermeintlich falsch positive und 26 vermeintlich falsch negative Ergebnisse)

Bei allen 94 getesteten Proben zeigte sich in der Vierfeldertafel, dass statistisch 21 falsch positive und 26 falsch negative Ergebnisse vorhanden waren.

Resultierend aus dieser Kontingenztafel wurde eine Sensitivität von 46 % und eine Spezifität von 54 % ermittelt (PPV = 0,51; NPV = 0,49).

Abschließend ist zur Auswertung des ELISpots zu sagen, dass sowohl zwischen den einzelnen Antigenen und dem Impfstatus der Patienten als auch bei Vergleich dieser untereinander keine relevanten Unterschiede ermittelt werden konnten.

3.5. Vergleich ELISA und ELISpot

Um die beiden Tests direkt zu vergleichen, wurde jeweils der Antikörpertiter, der im ELISA ermittelt wurde, mit der Anzahl der Leerwert-korrigierten Spots aus dem ELISpot verglichen.

Dabei wurden die einzelnen Antigen-Spots der Patienten mit den dazugehörigen ELISA-Titern in einem Punktdiagramm dargestellt und die Abhängigkeit derer mit Hilfe der Regressionsanalyse berechnet (Abb. 22 a - d).

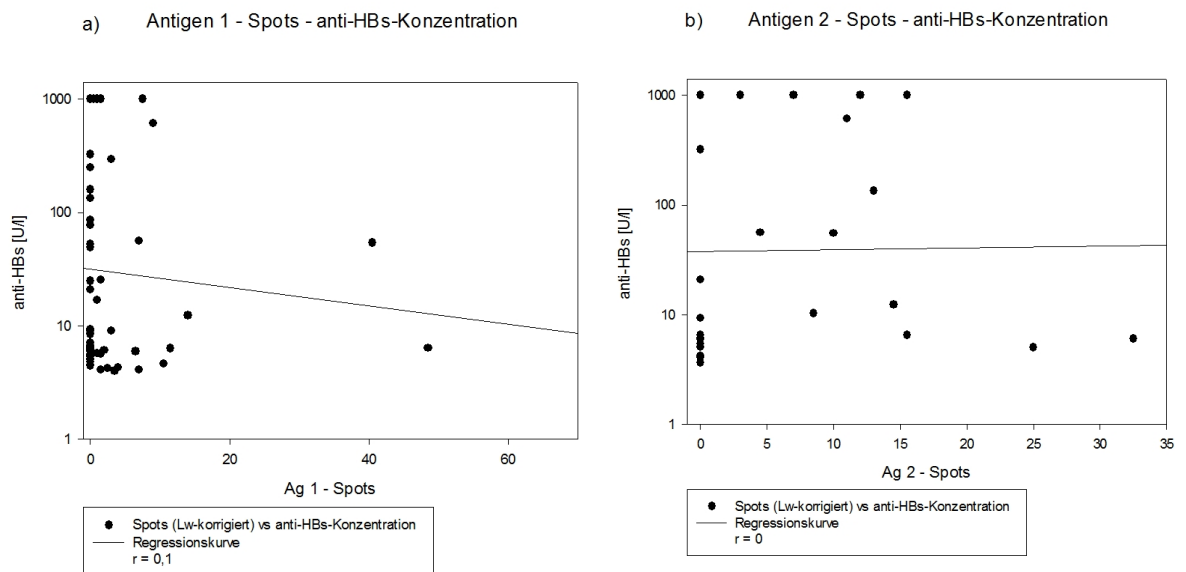


Abbildung 22 a + b: anti-HBs-Konzentration vs. ELISpot - Leerwert-korrigierte Spots

- a)** Antigen 1 - Leerwert-korrigierte Spots – Regressionskurvenanalyse
($p = 0,12$) ($n = 58$)
- b)** Antigen 2 - Leerwert-korrigierte Spots – Regressionskurvenanalyse
($p = 0,03$) ($n = 26$)

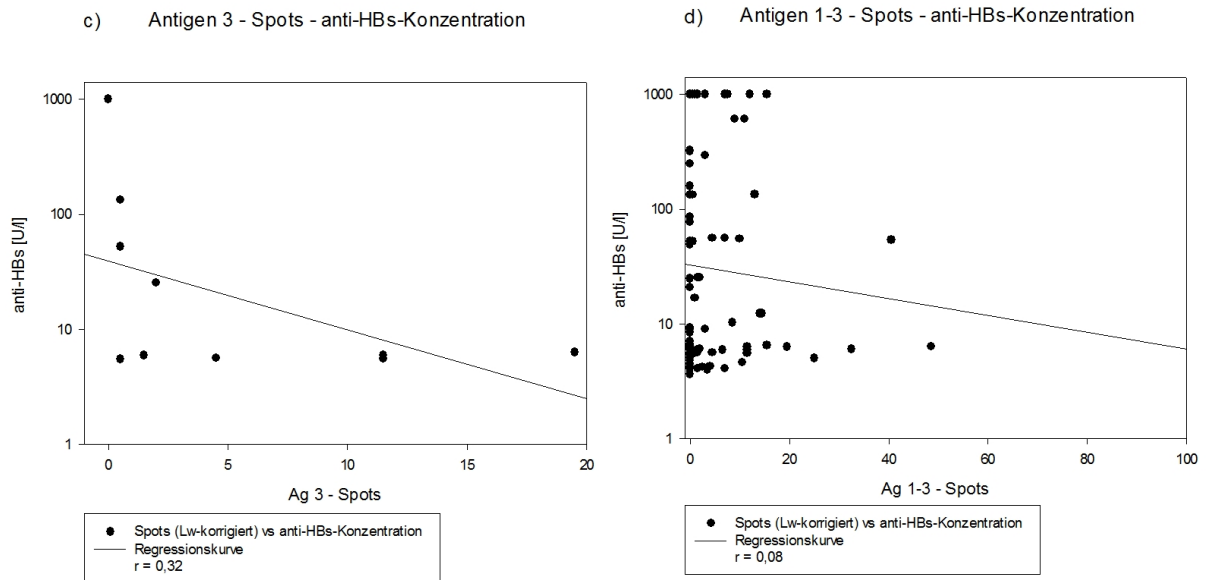


Abbildung 22 c + d: anti-HBs-Konzentration vs. ELISpot - Leerwert-korrigierte Spots

c) Antigen 3 - Leerwert-korrigierte Spots – Regressionskurvenanalyse

($p = 0,14$) ($n = 10$)

d) Antigen 1 - 3 - Leerwert-korrigierte Spots - Regressionskurvenanalyse

($p = 0,11$) ($n = 94$)

Bei Antigen 1 zeigte sich im Vergleich von ELISA und ELISpot, dass die Regressionskurve nahezu gegen 0 geht ($r = 0,1$) und somit eine Abhängigkeit zwischen den beiden Verfahren als eher unwahrscheinlich anzunehmen ist ($p = 0,12$) (Abb. 22 a).

Der ELISpot mittels Antigen 2 im Vergleich mit den zugehörigen AK-Titern aus dem ELISA zeigte einen Regressionswert von $r = 0$ und somit keine relevanten Zusammenhänge der beiden Parameter ($p = 0,03$) (Abb. 22 b).

Die ermittelten Spots mit Antigen 3 und die ELISA-Werte konnten mit Hilfe der Regressionsanalyse einen $r = 0,32$ errechnen ($p = 0,14$). Auch hier zeigt sich, dass es bei niedrigen Spots hohe und geringere AK-Titer bei den einzelnen Patienten gibt (Abb. 22 c).

In der Gesamtheit aller Spotwerte (Antigen 1, 2 und 3) im Vergleich zu den AK-Titern wurde ein Regressionswert $r = 0,08$ ermittelt und zeigt somit, wie auch bei dem Vergleich innerhalb der einzelnen Antigene, dass eine Abhängigkeit als eher unwahrscheinlich anzusehen ist ($p = 0,11$) (Abb. 22 d).

In der Untersuchung der ELISpot Spotanzahl zum ELISA-Titer zeigt sich sowohl bei den ELISpot-positiven Proben als auch bei den ELISpot-negativen kein Zusammenhang zwischen Höhe des anti-HBs-Titers und dem Ergebnis aus den ELISpot-Versuchen.

Im Folgenden werden nochmals separat die ELISpot-positiven und die ELISpot-negativen Proben vs. deren Antigen-Titer aus dem ELISA in einem Diagramm dargestellt und mittels Regressionsanalyse untersucht (Abb. 23).

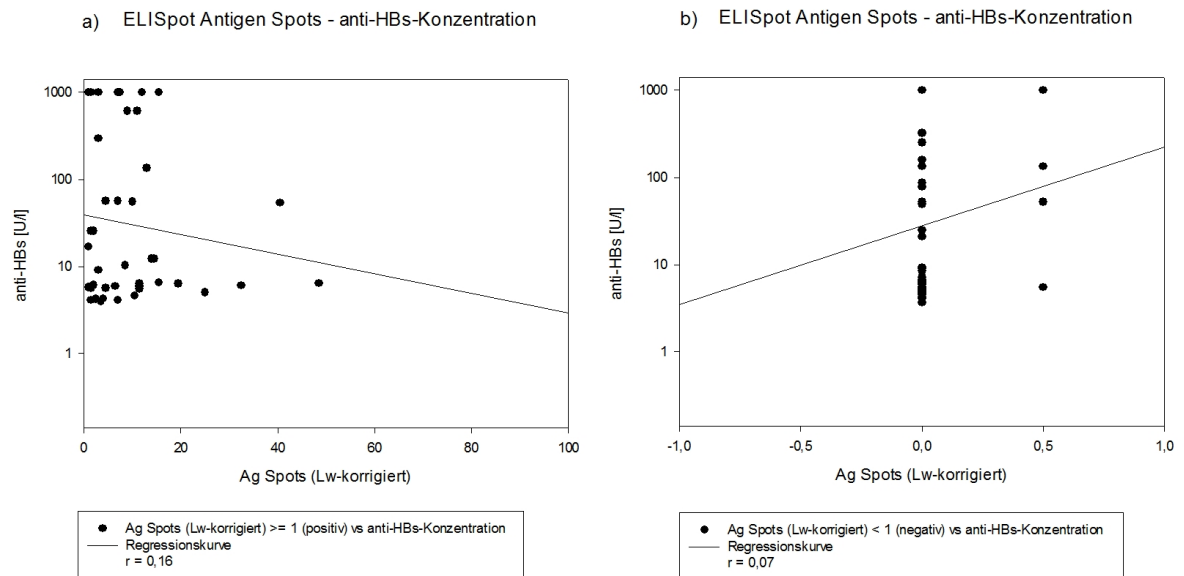


Abbildung 23 a + b: anti-HBs-Konzentration vs. ELISpot - Leerwert-korrigierte Spots

a) Antigen 1 - 3 - Leerwert-korrigierte Spots (Spots ≥ 1 = positives Testresultat) – Regressionskurvenanalyse ($p = 0,18$) ($n = 43$)

b) Antigen 1 - 3 - Leerwert-korrigierte Spots (Spots < 1 = negatives Testresultat) – Regressionskurvenanalyse ($p = 0,07$) ($n = 51$)

Die Analyse der ELISpot-positiven Werte ergaben einen Regressionswert von $r = 0,16$ ($p = 0,18$) (Abb. 23 a). Die Auswertung der ELISpot-negativen Proben mit Hilfe der Regressionsanalyse zeigte einen $r = 0,07$ ($p = 0,07$) (Abb. 23 b).

Es konnte demzufolge kein Zusammenhang zwischen ELISA-Titer und Spotanzahl im ELISpot nachgewiesen werden.

Weiterhin erfolgte der Vergleich der seropositiven Patienten im ELISA und den dazugehörigen ELISpot Werten als auch mit den seronegativen Proben (Abb. 24).

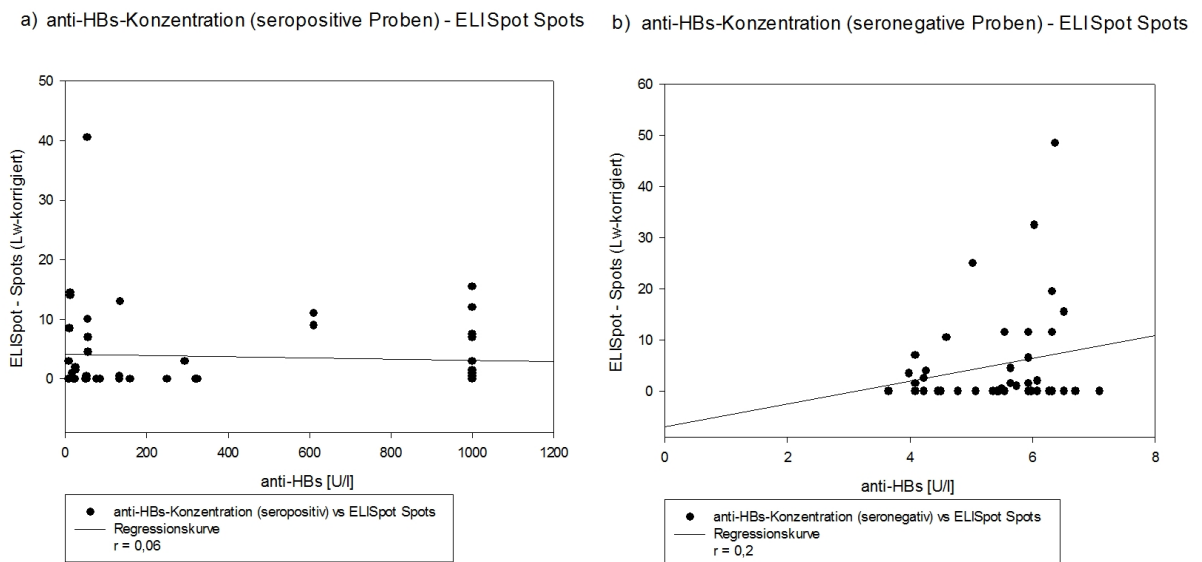


Abbildung 24 a + b: ELISpot - Leerwert-korrigierte Spots vs. anti-HBs-Konzentration

- a)** seropositive Proben (cut-off > 7,912 U/l) – Regressionskurvenanalyse
(p = 0,07) (n = 51)
- b)** seronegative Proben (cut-off < 7,912 U/l) – Regressionskurvenanalyse
(p = 0,25) (n = 43)

Es zeigte sich bei den seropositiven Werten im ELISA ein Regressionswert von $r = 0,06$ (p = 0,07) (Abb. 24 a). Die Auswertung der seronegativen Proben des ELISA mit Hilfe der Regressionsanalyse zeigte einen $r = 0,2$ (p = 0,25) (Abb. 24 b).

Die im ELISA als seronegativ ermittelten geimpften Patienten (Patient 24: AK-Titer = 5,55 U/l; Patient 66: AK-Titer = 6,03 U/l) waren im ELISpot sowohl negativ als auch positiv. Patient 24 wurde mittels Antigen 1 (Spots = 0) als negativ ermittelt und mit Hilfe von Antigen 3 (Spots = 11,5) als positiv. Die Probe von Patient 66 ergab ein positives Ergebnis bei Antigen 2 im ELISpot (Spots = 32,5).

Bei vier weiteren Patienten konnte ein seropositives Ergebnis gezeigt werden, jedoch lagen diese unter dem seroprotektiven Wert von 10 U/l (Patient 34: AK-Titer = 9,27 U/l; Patient 79: AK-Titer = 8,42 U/l; Patient 82: AK-Titer = 8,47 U/l; Patient 86: AK-Titer = 8,97 U/l). Im ELISpot zeigten sich bei jedem dieser Patienten keine spot-bildenden Zellen und ergaben somit ein negatives Ergebnis in der zellulären Testung.

Die seropositiven nicht geimpften Patienten im ELISA (Patient 18: AK-Titer = 52,22 U/l; Patient 22: AK-Titer = 25,49 U/l; Patient 36: AK-Titer = 1000 U/l und Patient 76: AK-Titer = 9,06 U/l) zeigten im ELISpot bei Patient 22 und Patient 76 auch ein positives Ergebnis (Patient 22: Antigen 1 Spots = 1,5 und Antigen 3 Spots = 2; Patient 76: Antigen 1 Spots = 3). Bei allen weiteren, nicht geimpften, jedoch seropositiven Patienten (# 18 und # 36) konnte das Ergebnis aus dem ELISA nicht reproduziert werden und ergab somit im ELISpot eine nicht vorhandene Reaktion (Patient 18: Antigen 1 Spots = 0, Antigen 3 Spots = 0,5, Patient 36: Antigen 1 Spots = 0, Antigen 2 Spots = 0). Patient 44 wurde in diese Auswertung nicht mit integriert, da die positive Kontrolle im ELISpot zu gering ausfiel [Leerwert > positive Kontrolle (PHA)].

Ein direkter Zusammenhang zwischen Antikörper-Titer und Spotanzahl kann aufgrund der vorangegangenen Analyse mit ziemlicher Sicherheit ausgeschlossen werden. Das Verteilungsmuster der einzelnen Proben ist rein willkürlich und verdeutlicht somit keine Abhängigkeit zwischen Höhe des anti-HBs-Titers im ELISA und der Spotzahl im ELISpot. Somit ist auch ein Zusammenhang zwischen ELISpot-Werten und Impfstatus aufgrund der Testresultate in dieser Arbeit als sehr unwahrscheinlich anzusehen.

4. Diskussion

Die Virushepatitis, eine der weltweit häufigsten viralen Infektionskrankheiten, stellt auch heute noch ein bedeutendes globales Gesundheitsproblem dar. Aufgrund der fast 240 Millionen chronisch Hepatitis B-Virussträgern (Prävalenz weltweit zwischen $< 2\%$ - $> 8\%$) ist es von großer Bedeutung, dass mit Hilfe von Impfprogrammen und Entwicklung von immer effektiveren Impfstoffen sowie deren protektiven Nachweis ein adäquater Schutz gegen das Hepatitis B-Virus vorhanden ist (Robert-Koch-Institut, 2014).

Das immunologische Gedächtnis nach Impfung mit einem Hepatitis B-Impfstoff soll bei guter primärer Antwort für ungefähr 15 Jahre anhalten (Lancet, 2000).

Jedoch wurden in den letzten Jahren vermehrt Studien zur zellulären Immunantwort nach Hepatitis B-Impfung veröffentlicht, in denen speziell auf die T-Zell-Antwort bei Kontakt mit Hepatitis B-Antigen eingegangen wurde (Bauer & Jilg, 2006; Bauer, 2003; Wang et al., 2011a; Zhang et al., 2010).

Eine Arbeit zur Ermittlung des Impfstatus im Verlauf bei geimpften Probanden und nicht geimpften Personen im Vergleich der zellulären und humoralen Komponente sucht man in der Literatur jedoch vergebens.

Das Ziel dieser Arbeit war es, den aktuellen Impfstatus von geimpften Personen auf zellulärer und humoraler Ebene zu ermitteln und diesen im Vergleich mit nicht geimpften Probanden zu untersuchen. Außerdem wurde bei seronegativ bleibenden geimpften Personen geschaut, ob eventuell nach Unterschreiten des protektiven anti-HBs-Tites dennoch eine zelluläre Antwort bei Stimulation mit einem Hepatitis B-Antigen bestand.

Wir entschieden uns grundsätzlich für die Verwendung von HBs-Antigen sowohl für die serologischen als auch für die zellulären Untersuchungen, da dieses Antigen in den Impfstoffen enthalten ist und die Charakterisierung der zellulären Antwort nach Infektion nicht im Fokus dieser Arbeit stand.

Dabei wurden der humorale Arm des Immunsystems mittels ELISA durch Ermittlung des anti-HBs-Titer untersucht und mit der zellulären Achse durch Ermittlung der Anzahl von spot-bildenden Zellen im ELISpot verglichen.

Hauptaugenmerk sollte dabei darauf gelegt werden, ob nach erfolgter Impfung ein T-Zell-Gedächtnis aufgebaut wurde. Dem gegenüber stand eine Kontrollgruppe mit nicht geimpften Probanden.

Schon zum geschichtlichen Beginn der Hepatitis B-Virus-Impfungen zeigte sich, dass das Messen des anti-HBs-Titers die effektivste Methode darstellt, den Schutz gegen eine Infektion mit dem Hepatitis B-Virus nachzuweisen (Krugman, 1975).

Schon 1989 zeigte Wismans et al., dass eine Boosterung nach Verlust eines protektiven AK-Titers zu einer exzellenten humoralen Antwort führt und somit ein noch vorhandenes Immungedächtnis gegenüber HBsAg zeigt (Wismans et al., 1989). Außerdem wurde durch Bauer und Jilg nachgewiesen, dass es nach Stimulation zu einer in vitro Produktion von anti-HBs in zirkulierenden B-Zellen kommt (Bauer & Jilg, 2006).

Aufgrund dieser Studien legten der Centers for Disease Control and Prevention (CDC) und der Canadian National Advisory Committee on Immunization 1991 und 1992 fest, dass keine Boosterung bei gesunden Personen durchzuführen ist, die grundimmunisiert sind (Holton, 1992; Mast et al., 2005). In Europa wurde diese Empfehlung nach einer Publikation im Lancet 2000 veröffentlicht und besagt, dass keine Auffrischimpfung bei gesunden Kleinkindern, Jugendlichen und Erwachsenen zu empfehlen ist (Lancet, 2000). Dies bedeutete erhebliche Kosteneinsparungen, vor allem in Ländern der Dritten Welt.

Jedoch wurde weiterhin empfohlen, bei Personen mit niedriger primärer oder sekundärer Antwort zu screenen und bei Titern < 10 U/l eine Boosterung durchzuführen. Das Robert-Koch-Institut empfiehlt, bei Hepatitis B-gefährdeten Personen im Gesundheitsdienst eine Impfung durchzuführen, jedoch wird in den Empfehlungen kein Hinweis auf eine Boosterung gegeben. Es wird nur die Information gegeben, dass ein Titer von > 100 U/l einen Schutz von mindestens zehn Jahren gewährleistet (Robert-Koch-Institut, 2011).

Bei unseren Untersuchungen zeigte sich, dass im ELISA die humorale Antwort des Immunsystems sehr gut erfasst werden konnte und bei 95,2 % der geimpften Personen ein positiver anti-HBs-Titer nachzuweisen war (anti-HBs $>$ cut-off). Bei den zwei Patienten, welche keinen AK-Titer aufwiesen, lag die Impfung einmal zwölf Jahre zurück und bei dem anderen Patienten, aufgrund inkompletter Dokumentation im Impfausweis, war diese nicht ermittelbar. Eine Seroprotektivität (Titer > 10 U/l) zeigte sich bei 36 von 42 geimpften Patienten (86 %). Bei fünf der 44 nach eigenen Angaben nicht geimpften Patienten (11 %) konnte ein seropositiver Antikörpertiter ermittelt werden. Jedoch war es aufgrund des

Studiendesigns nicht möglich, die Patientenproben auf eine zurückliegende, unentdeckte Hepatitis B-Infektion oder bereits erfolgte Impfung zu untersuchen.

Gleiche Ergebnisse zeigte eine Studie von Chinchai et al., welche die Patienten nach ca. 18 - 20 Jahren nach Immunisierung auf anti-HBs untersuchten. Es zeigte sich, dass bei 84 % weiterhin zirkulierende Antikörper im Serum nachzuweisen waren. Jedoch lag nur bei 59 % der anti-HBs-Titer bei $> 10 \text{ U/l}$, was eine Seroprotektion beweist (Chinchai et al., 2009).

Auch Gabbuti et al. untersuchte Patienten, welche vor mehr als zehn Jahren gegen Hepatitis B geimpft wurden. Es zeigte sich, dass 90 % der Patienten weiterhin einen AK-Titer $> 10 \text{ U/l}$ hatten und die Personen mit einem geringeren Titer nach einer Boosterung einen seropositiven Impfstatus aufwiesen. Diese Daten weisen darauf hin, dass eine dreifache Impfung mit einem Hepatitis B-Impfstoff zu einer Langzeitimmunität führt und eine Boosterung bei primär guter Immunantwort routinemäßig nicht durchzuführen sein muss. Eine Impfung bei Verlust der Seroprotektion, wenn der AK-Titer unter 10 U/l gefallen ist, scheint demzufolge sinnvoll. Jedoch sollte ein Zehn-Jahres-Rhythmus nicht zwingend eingehalten werden, da aus diesen Ergebnissen hervorgeht, dass auch nach Zeiten über zehn Jahren eine immunkompetente humorale Abwehr besteht (Gabbuti et al., 2007).

Im Zuge dieser Arbeit wurde die Höhe des im ELISA ermittelten anti-HBs-IgG Antikörpertiters mit verschiedenen Patientendaten - wie Impfstatus, Geschlecht, Alter, Anzahl der Impfungen und Abstand zur letzten Impfung - untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass aufgrund der in dieser Arbeit ermittelten Daten es nur bei geimpften Patienten zu einem signifikanten höherem Antikörpertiter kam als bei nicht geimpften Probanden. Die Faktoren Geschlecht, Anzahl der Impfung und Abstand zur letzten Impfung wiesen keine signifikanten Unterschiede innerhalb der einzelnen Gruppen auf. Beim Vergleich des Alters fiel auf, dass die Gruppe der unter 20-Jährigen im signifikant geringere Titer aufwiesen als die anderen Altersgruppen. Ab einem Alter von 20 Jahren nahm mit steigendem Alter der anti-HBs-Titer ab. Im direkten Vergleich der Altersgruppen „20-29 Jahre“, „30-39 Jahre“ und „40-49 Jahre“ wurde aber kein signifikanter Zusammenhang gefunden ($1 > p > 0,09$).

Jedoch zeigen andere Studien, wie Fisman et al., dass mit steigendem Lebensalter auch die Anzahl der Non-responder ansteigt und somit generell mit einem niedrigeren Antikörpertiter ab einem Alter von ca. 30 Jahren gerechnet werden kann (Fisman et al., 2002). Dies konnte in dieser Arbeit jedoch nicht nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass Patienten unter

20 Jahren den geringsten anti-HBs-Titer mit einem Mittelwert von 25,7 U/l (SEM=8,3) aufwiesen. Bei den Patienten zwischen 20 und 29 Jahren wurde ein Titer von 144,5 U/l (SEM=31,1) und bei den Patienten über 40 Jahren ein Antikörpertiter von 43,2 U/l (SEM=13,3) im Mittel errechnet. Im Signifikanztest wurde ein Wert von $1 > p > 0,09$ ermittelt und zeigt somit kein signifikantes, zusammenhängendes Ergebnis zwischen den einzelnen Gruppen auf.

Auch Struve et al. zeigten, dass das weibliche Geschlecht einen positiven Einfluss auf die Immunantwort nach Impfung hat (Struve et al., 1992). In dieser hier vorliegenden Studie konnte bei den männlichen Probanden ein Antikörpertiter-Mittelwert von 86,9 U/l (SEM=25,5) und bei den weiblichen Patienten von 124,1 U/l (SEM=30,3) errechnet werden. Mittels der Vergleichsanalyse konnten wir jedoch keinen signifikanten Unterschied feststellen ($p = 0,83$).

Auch die Faktoren Rauchen, Übergewicht, Immundefizite und bestimmte genetische Faktoren haben negativen Einfluss auf den zu erwartenden Antikörpertiter nach Impfung mit einem Hepatitis B-Impfstoff (Buti et al., 1992; Noh et al., 2003; Roome et al., 1993; Wang & Lin, 2007). Diese Parameter wurden im Zuge dieser Arbeit nicht ermittelt und untersucht.

Die Frage, ob bei Low- oder Non-respondern nach den ersten drei Impfungen trotz nicht nachzuweisenden anti-HBs-AK-Titers eine Immunität besteht, bleibt jedoch bestehen.

Um dies zu klären, wurden im Zuge dieser Arbeit die gewonnenen Patientenproben mittels ELISpot auf ihre zelluläre Immunität untersucht.

Es wurde die Anzahl der spot-bildenden Zellen (SFC) ermittelt und es zeigte sich, dass es bei 43 von 94 untersuchten Patientenproben zu einer Ausschüttung von IFN- γ nach Stimulation mit HBsAg kam. Davon waren 51,2 % geimpft. Von allen geimpften Personen zeigten 45,8 % eine positive Reaktion im ELISpot (22 von 48), wobei auch 45,7 % der nicht geimpften Patienten spot-bildende Zellen aufwiesen (21 von 46).

In dieser Arbeit wurden ausschließlich die T-Zellantwort auf HBs-Antigen untersucht, da das Hauptaugenmerk auf den Impfstatus gelegt wurde und in Deutschland alle drei Impfstoffe HBsAg enthalten.

Grundsätzlich ist anzumerken, dass nur eine geringe Anzahl positiver Spots gefunden wurde. Dies schränkt die Nutzbarkeit des Verfahrens ein. Mögliche Verbesserungen diskutieren wir am Ende dieses Kapitels.

Aus diesen Ergebnissen resultierend konnte für das ELISpot-Verfahren eine Sensitivität von 46 % und eine Spezifität von 54 % ermittelt werden.

Diese Unspezifität resultiert am ehestens aus der geringen Anzahl antigenspezifischer T-Zellen. Aufgrund der geringen Frequenz der Zellen können die Messergebnisse unzuverlässig bleiben. Solch einen Ansatz analysierten Hedley et al. mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei einer geringen Zellpopulation in der Gesamtheit der Zellen zum Nachweis eines Ereignisses sich über die Poisson-Verteilung statistisch bedingt falsch positive Ergebnisse ergeben. Dies könnte durch eine Erhöhung der zu untersuchenden Zellen vermindert werden (Hedley et al., 2013).

Eine ähnliche Untersuchung führten auch Bauer und Jilg durch. Sie isolierten direkt CD4+-T-Zellen von Patienten, welche erfolgreich geimpft wurden und deren ihr AK-Titer $<10\text{U/l}$ im Verlauf gesunken war, und reicherten diese an, sodass eine Stimulation mit HBsAg zu einer effektiver Reaktion der Gedächtniszellen führte. Bei allen Patienten konnte trotz nicht vorhandener Seroprotektion HBs-Ag-spezifische CD4+-T-Zellen nachgewiesen werden. Nach Stimulation der isolierten Zellen mit HBsAg konnte nach vier Tagen ein erhöhter anti-HBs-Titer nachgewiesen werden (Bauer & Jilg, 2006). Man kann also davon ausgehen, dass selbst bei nicht vorhandenem protektiven AK-Titer noch ein Immungedächtnis vorhanden ist und dieses durch Stimulation mit dem spezifischen Antigen zu einem Anstieg des AK-Titer führen kann, was wiederum auf eine adäquate T- bzw. B-Zell-Antwort zurückzuführen ist.

Bauer und Jilg konnten jedoch nur ein bis zwei spezifische T-Gedächtniszellen in einer Millionen PBMC und zwei bis vier spezifische B-Gedächtniszellen ausfindig machen. Dies erklärt das schwierige Nachweisen dieser Zelle. Ohne eine Anreicherung ist es sehr schwierig, diese Zellen herauszufinden und zum Nachweis der zellulären Immunität mittels ELISpot zu verwenden. Diese Studie zeigte die Existenz von T- + B-Gedächtniszellen in Patienten, welche gegen Hepatitis B geimpft wurden und ihren anti-HBs-Titer verloren haben. Aufgrund der geringen Anzahl von spezifischen Zellen mussten diese angereichert werden und mittels sensitivem ELISpot nachgewiesen werden (Bauer, 2003).

Das kann bei späteren Studien nützlich sein, um die Frage zu klären, wie lange die Immunität anhält, vor allem bei Personen, welche initial eine gute Reaktion auf die Impfung zeigten ($\text{anti-HBs} > 100\text{U/l}$) und im Verlauf die Seroprotektion verlieren.

Die Lebenszeit von T-Memoryzellen wird in der Literatur mit unterschiedlichen Angaben festgelegt. Zum einen wird es von dem verwendeten Impfstoff abhängig gemacht. Andererseits wird diskutiert, dass in einigen Probanden CD4+ und CD8+ spezifische T-Gedächtniszellen 50 Jahre nach der Impfung nachgewiesen wurden. Dabei wird argumentiert, dass selbst bei Abwesenheit vom Antigen die Zellen in einem Steady state bleiben bzw. einige von ihnen sich teilen, um eine gewisse Anzahl von suffizienten Memoryzellen zu gewährleisten, um ein kompetentes Immungedächtnis aufrecht zu erhalten (Mak & Saunders, 2005).

Bauer zeigte, dass es im Zuge einer Reinfektion bzw. bei Rekontakt mit dem Agens ganz natürlich ist, dass sich T-Effektorzellen ausbilden und diese nach einer gewissen Zeit durch Apoptose abgebaut werden und ein Teil sich zu T-Memoryzellen differenzieren und dafür sorgen, dass eine Protektion bei zukünftigen Infektionen vorhanden ist. Dieser Mechanismus kompensiert den natürlichen Alterungsprozess der Lymphozyten, welcher selbst durch einen antiapoptotischen Mechanismus auf Basis des Bcl-Gens verlängert wird (Bauer, 2003; Mak & Saunders, 2005).

Einige Studien zeigen, dass mit steigendem Alter auch die native T-Zell-Lebenszeit zunimmt und deren Funktion jedoch abnimmt. Das liegt vor allem an der verminderten Expression von BIM (BCL-Familie), welches - wie oben beschrieben - die Zellen vor Apoptose schützen (Tsukamoto et al., 2009, 2010).

Es wurde außerdem gezeigt, dass die Differenzierung zu Memoryzellen unabhängig vom Antigen sowie dem Mechanismus der T-Effektorzellen ist und auch unabhängig von der autokrinen Zytokinsekretion der CD4+-T-Zellen (Swain, 2000).

Weitere Arbeiten zeigten, dass Adjuvantien bzw. verschiedene Konzentrationen des Impfstoffes zu besserem Impferfolg und demzufolge einen besseren Nachweis der Immunität erzielten.

Yang et al. zeigte eine erhöhte zelluläre und humorale Antwort auf PreS1 + S2-Ag im Vergleich zu HBsAg, bzw. HBcAg (Yang et al., 2012).

Wang et al. wies nach, dass nach Impfung mit einer Dosis von 5 µg, statt 2 µg erweitertem Hepatitis-Impfstoff die spot-bildenden Zellen vermehrt nachzuweisen waren. Außerdem wurde eine erhöhte IFN-γ-Ausschüttung nach Stimulation mit einem Peptid im Vergleich zu einem Protein-basierenden Antigen aufgezeigt (Wang et al., 2011a).

In einer anderen Arbeit wurde die Kombination von Hepatitis B-Impfstoff und HSP70 bzw. gp96 untersucht und gezeigt, dass es durch diese Kombination im Vergleich zum Einzelimpfstoff zu einer vermehrten Anzahl von IFN- γ -sekretierenden Zellen und einem erhöhten anti-HBs-Titer kam (Wang et al., 2011b).

Zhang et al. untersuchten die Anzahl von spot-bildenden Zellen (IL4 und IFN- γ) nach Impfung mit einem Hepatitis B-Impfstoff. Zum einen zeigte sich eine erhöhte Zahl von IL4-sekretierenden Zellen, wenn der Impfstoff 20 μ g statt 10 μ g betrug, was jedoch nicht für IFN- γ galt (Zhang et al., 2010). Kurz nach der Impfung korrelierte die Anzahl der SFC von IL4 mit dem Antikörper-Titer. Dies zeigt, dass auch der Nachweis anderer Zytokine, wie IL4, IL2 oder IFN- γ , zur Ermittlung der SFC genutzt werden kann. In dieser hier vorgelegten Arbeit wurde das Hauptaugenmerk auf die Ausschüttung von IFN- γ gelegt, da dies auch in anderen Arbeiten als sehr gut aussagekräftiges Zytokin herangezogen wurde (Chen et al., 2011; O'Connor et al., 2013; Yang et al., 2012).

All diese Arbeiten zeigen, dass sowohl die Nachweismethode als auch die Entwicklung eines moderneren Impfstoffes einen erheblichen Anteil zur Verbesserung der Immunitätsschaffung nach Impfung gegen eine Hepatitis B-Infektion beitragen könnten.

In dieser Arbeit wurden speziell die seronegativen geimpften Patientenproben auf die Anzahl ihrer spot-bildenden Zellen untersucht, um eventuell ein bestehendes Immungedächtnis nach Verlust des protektiven anti-HBs-Titers nachzuweisen. Auch die seropositiven nicht geimpften Proben wurden genauer analysiert. Es zeigte sich, dass bei zwei geimpften Patienten ein Antikörpertiter $< 6,1$ U/l bestand und somit kein suffizienter Schutz gegenüber einer Hepatitis B-Infektion vorlag. Bei der zellulären Untersuchung dieser beiden Proben mittels ELISpot konnte bei einem Patienten ein positives Ergebnis mit 32,5 Spots und bei dem anderen Probanden jeweils ein negatives (Spots = 0) und ein positives Resultat (Spots = 11,5) ermittelt werden. Mindestens einer der beiden Probanden ist also vermutlich durch seine T-zelluläre Immunität geschützt.

Bei den vier seropositiven, vermutlich nicht geimpften Patienten, die wir im ELISpot untersuchen konnten, wurden bei zwei Personen reaktive T-Zellen nachgewiesen und bei den anderen beiden wurden keine spot-bildenden Zellen gefunden.

Bei vier seropositiven geimpften Patienten, deren Antikörper-Titer unter den seroprotektiven Wert von 10 U/l gefallen war, konnten im ELISpot keine spot-bildenden Zellen aufgezeigt werden.

In einer anderen Arbeit von Weirauch et al. kam man zum Ergebnis, dass Low- und Non-responder auf HBsAg auch eine geringe oder gar keine T-Zell-Antwort zeigten. Im Gegensatz dazu wurde nachgewiesen, dass Patienten die initial gut auf den Impfstoff reagierten, auch eine starke T-Zell-Antwort nach der dritten Impfung zeigten. Auffallend dabei war bei diesen Patienten sogar eine Reaktion vor der ersten Impfung. Diese Studie zeigt, dass kein generelles Immundefizit bei Low- oder Non-respondern vorhanden ist. Die Induktion von anti-HBsAg ist eher von einem präexistierenden T-Zell-Pool abhängig (Weirauch et al., 2008). Bei unseren Probanden war allerdings kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen zellulärer und serologischer Immunantwort zu finden.

Die letzte genannte Studie spiegelt somit auch die Ergebnisse dieser Arbeit wieder, dass auch bei nicht geimpften Personen mit einem kompetenten Immunsystem ein positiver Nachweis von SFC möglich ist. Dies kann vielerlei Ursachen haben, wie z. B. den unbewussten Kontakt mit Hepatitis B-Antigen im Rahmen einer Infektion oder einer nicht mehr rememberlichen Immunisierung.

Der direkte Vergleich der Höhe des anti-HBs-Titers mit der Anzahl der Spots im ELISpot ergab in unserer Vergleichsanalyse keine signifikanten Zusammenhänge.

Die Frage nach der Relevanz des ELISpot zur Diagnostik einer bestehenden Immunität nach Impfung ist demnach kritisch zu sehen. Sie geht einher mit einer aufwendigen sensitiven Diagnostik, welche auch primär über den Nachweis der Antikörper mittels ELISA statt des ELISpot durchführbar ist.

Man kann also primär davon ausgehen, dass durch die initiale Impfung ein T- bzw. B-Zellgedächtnis aufgebaut wird und dieses im Verlauf nachweisbar ist, jedoch mit aufwendiger Diagnostik. Da bei Low- bzw. Non-respondern ein eher träger Anstieg des anti-HBs-Titers nachzuweisen ist, kann man davon ausgehen bzw. zeigten die oben genannten Studien dieses auch, dass die korrelierende T-Zell-Antwort dementsprechend gering ausfällt. Unter dem Aspekt, dass der ELISpot unter Anreicherung der spezifischen Zellen durchgeführt wurde.

Abgesehen vom Nachweis des Impfstatus ist die Relevanz des ELISpot in der Diagnostik und Verlaufskontrolle bei akuter oder chronischer Infektion mit dem Hepatitis B-Virus von größerer Bedeutung.

Feng et al. untersuchten Mittels ELISpot die Wichtigkeit der Diagnostik und Verlaufskontrolle bei chronisch Hepatitis B-Infizierten. Dabei zeigte sich, dass die antivirale Therapie zu einem Anstieg der T-Zell-Reaktivität führte und somit die spezifische T-Zell-Antwort zur Verifizierung der adäquaten Therapie mit Hilfe des ELISpot ein suffizientes und aussagekräftiges Ergebnis liefern können (Feng et al., 2012b).

Feng et al. führten eine Studie an Patienten durch, welche Hepatitis B positiv waren. Es wurde die T-Zell-Antwort auf verschiedene Hepatitis-Antigene bei chronisch und akut infizierten Probanden untersucht. Dabei zeigte sich, dass die zelluläre Immunantwort am höchsten bei inaktiven HBV-Trägern (keine HBV-DNA nachweisbar) war und die T-Zellen am höchsten auf das HBcAg reagierten (Feng et al., 2012a).

Diese Arbeiten zeigen, dass man den ELISpot zum Nachweis der Immunkompetenz des zellulären Immungedächtnisses bei infizierten Patienten anwenden sollte, um so einen besseren Überblick über die Infektionssituation bzw. die Effektivität der antiviralen Behandlung zu erlangen.

Die vorliegenden Ergebnisse sprechen also dafür, dass man davon ausgehen kann, dass der Goldstandard zur Ermittlung der Immunität nach Hepatitis B-Impfung mittels ELISA erfolgen sollte. Da dies die humorale Seite des Immunsystems widerspiegelt, aber auch indirekt den initialen zellulären Aspekt wiedergibt.

Die zelluläre Testung mittels ELISpot wies leider keinen signifikanten Zusammenhang zwischen anti-HBs-Titer und Anzahl der Spot-bildenden Zellen nach, da selbst bei nicht geimpften Personen und einem Bruchteil der geimpften Patienten ein positives Ergebnis ermittelt wurde. Man kann also davon ausgehen, dass entweder eine sensitivere Nachweismethode angestrebt werden sollte oder die bestehende - wie oben beschrieben - verbessert werden müsste oder dass man aufgrund der Individualität der Probanden davon ausgehen kann, dass im Verlauf der Impfung auch die Reagibilität der T-Memoryzellen abnimmt bzw. bei Personen, die keine Impfung erhalten hatten, ein präexistierender T-Zell-Pool vorhanden ist oder eventuell ein Kontakt mit dem Hepatitis B-Antigen in der Vergangenheit erfolgt ist. Angesichts dieser vielfältigen und schwierig zu ermittelnden Einflussfaktoren wird - in Berufung auf die Ergebnisse in dieser Arbeit - die Sensitivität und Spezifität des ELISpots zur Ermittlung eines suffizienten Immunstatus gegenüber dem untersuchten Antigen eher eine untergeordnete Rolle zugeteilt. Es sollte weiterhin der ELISA zur Ermittlung des anti-HBs-

Titers angewandt und die Boosterung gemäß der Empfehlung genannter Organisationen durchgeführt werden.

Einzig die genauere Untersuchung von Low- oder Non-respondern könnte mit Hilfe des ELISpot zu einer genaueren Feststellung der Immunität nach erfolgter Impfung beitragen.

Für zukünftige Experimente sollte die Methodik so verändert werden, dass primär beim ELISpot die speziellen Zellpopulationen, welche untersucht werden sollen, isoliert werden und gegebenenfalls angereichert werden, um zum einen die präexistierenden Zellen zu ermitteln und zum anderen deren Reaktion auf das Antigen, hinsichtlich der Erfassung der Zytokinausschüttung, zu verbessern. Als Messverfahren könnte dabei auch die Durchflusszytometrie zum Nachweis intrazellulärer Zytokine dienen.

Außerdem könnte das ELISpot-Verfahren zur Untersuchung von Patienten genutzt werden, um eine Hepatitis B-Infektion zu diagnostizieren, wie es heutzutage schon gemacht wird. Der Impfstatus und die damit einhergehende Immunität gegenüber dem Hepatitis B-Virus ist auch von großer Bedeutung, doch durch die erhöhte Spezifizierung der zellulären Nachweismethode wird der zeitliche, finanzielle und generell wirtschaftliche Aspekt nicht erfüllt. Die Ermittlung der humoralen Komponente für den Impfstatus ist ausreichend, um eine Aussage zum Schutz des Patienten zu geben und benötigt primär keine weitere Diagnostik. Lediglich für Patienten, welche in der Vergangenheit eine Impfung erhalten hatten und deren Seroprotektion verloren gegangen ist, könnten mit Hilfe des ELISpot eine weiterhin bestehende Immunität auf zellulärer Ebene nachgewiesen werden und somit ein Schutz vor einer Hepatitis B-Infektion aufzeigen. Auch die Frage nach der Immunität bei Non- oder Low-respondern könnte in Zukunft eventuell durch verbesserte Nachweismethoden auf zellulärer Ebene eine Antwort geben. Doch sollte dahingehend eher eine Verbesserung des Impfstoffes angestrebt werden, sodass auch Personen mit schlechter primärer oder sekundärer Reaktion auf das Antigen besser bzw. effizienter reagieren. In dieser Hinsicht kann der ELISpot zur Ermittlung neuerer Impfstoffe auf jeden Fall herangezogen werden, um den Einfluss auf die T- bzw. B-Zellen widerzuspiegeln und diesen Prozess auch zu verbessern.

5. Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

Untersuchungen zur humoralen und zellulären Immunantwort auf HBs-Antigen unter Berücksichtigung des Impfstatus

eingereicht von:

Thomas Zeuner

angefertigt am:

Institut für Klinische Immunologie der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

betreut von:

Prof. Dr. med. Ulrich Sack

Januar 2015

Die Virushepatitis gehört weltweit zu den häufigsten viralen Erkrankungen. Ein Infektionsschutz kann durch eine frühzeitige Impfung aufgebaut und dieser durch eine sensitive Nachweismethode aufgezeigt werden.

Laut WHO waren weltweit schon ca. 30 % aller Menschen (2 Milliarden) mit dem Hepatitis B-Virus infiziert und 3 % (240 Millionen) leiden an einer chronischen Hepatitis B-Infektion. Bei 20 - 30 % der chronisch infizierten Personen kann diese in eine Leberzirrhose übergehen, welche im weiteren Verlauf auch das Risiko der Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms in sich birgt.

Die Ständige Impfkommission nahm 1995 die Hepatitis B-Impfung in ihre aktuellen Empfehlungen auf. Dabei besteht die Grundimmunisierung aus einer dreifachen Gabe des Impfstoffes - einem rekombinanten Hepatitis-Oberflächenantigens (HBs), welcher bei dem sphärisch umhüllten DNA-Virus in der Lipidhülle vorkommt.

Der aktuelle Goldstandard zum Nachweis des Impfschutzes ist der ELISA, welcher bei seropositiven Probanden anti-HBs-Antikörper detektieren kann.

Im Zuge dieser Arbeit wurde ein Patientenkollektiv aus geimpften und nicht geimpften Patienten rekrutiert und deren Blutproben auf serologische und zelluläre Reaktivität nach Hepatitis B-Impfung mittels ELISA und ELISpot untersucht.

Insgesamt konnten 90 Patientenproben akquiriert werden. Dabei mussten folgende Einschlusskriterien erfüllt sein: Alter zwischen 16 und 50 Jahren, keine schweren Begleiterkrankungen, kein Immunsuppressiva in der Medikamentenanamnese, keine zurückliegende Hepatitis B-Infektion und keine vorliegende Schwangerschaft.

Die Proben wurden in einer Allgemeinarztpraxis entnommen, verblindet und binnen 24 Stunden weiterverarbeitet.

Insgesamt konnten 86 Patientenproben in die Studie einbezogen und mittels ELISA und ELISpot untersucht werden. Dabei waren 49 % (n = 42) der Patienten nachweislich geimpft und 51 % (n = 44) berichteten über keine Immunisierung gegen Hepatitis B.

Das ELISA-Verfahren wurde mit Hilfe eines kommerziellen Kits durchgeführt und zeigte bei 95 % der geimpften Personen eine positive anti-HBs-Antikörper-Konzentration. Eine Spezifität von 89 % konnte bei diesem Testverfahren aufgezeigt werden. Außerdem erfolgte der Vergleich zwischen der Höhe des Antikörper-Titers und Anzahl der Impfungen, Zeit seit der letzten Impfung, Geschlecht, Alter und generellem Impfstatus. Dabei konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in diesem Patientenkollektiv nur der Faktor Impfung zu einem signifikant höheren anti-HBs-Titer führte und die anderen Faktoren nicht korrelierten.

Um den zellulären Arm des Immunsystems genauer zu analysieren, wurde ein ELISpot-Verfahren etabliert und damit die IFN- γ -Sekretion von HBs-reaktiven T-Zellen untersucht und mit den Ergebnissen der serologischen Nachweismethode verglichen.

Nach der Entwicklung eines ELISpot-Systems für den Nachweis Hepatitis B-reaktiver T-Zellen, in denen die optimale Art der Mikrotiterplatte, Konzentration des verwendeten Antigens und Inkubationszeit ermittelt wurden, erfolgten jeweils parallele Doppelbestimmungen der spot-bildenden Zellen mit Berechnung des Mittelwertes der Leerwert-korrigierten Spots.

Es standen drei verschiedene Antigene zur Verfügung, welche sowohl allein als auch im Vergleich miteinander untersucht wurden.

Insgesamt konnte bei 43 von 94 Patientenproben (46 %) eine antigenspezifische IFN- γ -Sekretion nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich bei 46 % der geimpften Patienten ein positives Ergebnis. Auch bei 46 % der anamnestisch nicht geimpften Patienten konnte eine positive Anzahl von spot-bildenden Zellen aufgezeigt werden. Diese Unspezifität

resultiert vor allem aus der geringen Anzahl antigenspezifischer T-Zellen. Über die Poisson-Verteilung ergeben sich hier - statistisch bedingt - falsch positive Ergebnisse.

Um die Nichtkonverter im ELISA genauer zu analysieren, wurden speziell diese auf ihre Spotanzahl im ELISpot untersucht und geprüft, ob diese zelluläre Reaktion nach zurückliegender Impfung eine Aussagekraft bezüglich des aktuellen Impfstatus haben.

Bei zwei seronegativen geimpften Patienten konnte jeweils ein positives Ergebnis im ELISpot aufgezeigt werden. Bei vier seropositiven Probanden, die jedoch keinen seroprotektiven Antikörper-Titer ($\text{cut-off} > \text{AK-Titer} > 10 \text{ U/l}$) aufwiesen, konnte kein positives Ergebnis in der zellulären Testung gezeigt werden. Bei den seropositiven, aber anamnestisch nicht geimpften Patienten zeigte sich jeweils bei einem ein positives und bei einem ein negatives ELISpot-Ergebnis.

Ein direkter Zusammenhang zwischen Höhe des Antikörper-Titers im ELISA und Anzahl der spot-bildenden Zellen im ELISpot konnte im Zuge dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden, da selbst bei nicht geimpften Personen und einem Bruchteil der geimpften ein positives Ergebnis ermittelt wurde.

Wir schlussfolgern daraus, dass unbedingt eine sensitivere Nachweismethode angestrebt werden muss. Aufgrund der Individualität der Probanden gehen wir davon aus, dass nach der Impfung im Verlauf auch die Anzahl nachweisbarer T-Memoryzellen abnimmt. Bei Personen, die anamnestisch keine Impfung erhalten hatten, hat vermutlich ein nicht bemerkter Kontakt mit dem Hepatitis B-Antigen in der Vergangenheit stattgefunden oder die Impfung ist nicht dokumentiert. Angesichts dieser vielfältigen und schwierig auszuschließenden Einflussfaktoren werden als Ergebnis dieser Arbeit Sensitivität und Spezifität des ELISpots zur Ermittlung eines suffizienten Immunstatus gegenüber dem HBs-Antigen als noch nicht ausreichend bewertet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen somit, dass die serologische Untersuchung mittels ELISA weiterhin den Goldstandard darstellt, um einen aktuellen Hepatitis B-Impfschutz aufzuzeigen. Bei weiterer Testoptimierung der zellulären Methode mit dem ELISpot-Verfahren könnten in Zukunft Low- oder Non-Responder bzw. Patienten, deren vorhandene Seroprotektivität nicht mehr nachweisbar ist, genauer analysiert werden, um gegebenenfalls einen vorhandenen zellulären Impfschutz zu beweisen. Auch könnte dem ELISpot in der Diagnostik und Verlaufskontrolle bei akuter oder chronischer Infektion mit dem Hepatitis B-Virus sowie zur Entwicklung modernerer und effektiverer Impfstoffe zukünftig eine größere Bedeutung zukommen.

6. Literaturverzeichnis

1. Almeida, J D (1972): Individual morphological variations seen in Australia antigen positive sera. *American journal of diseases of children*. 123 (4), 303–309.
2. Almeida, J D; Rubenstein, D; Stott, E J (1971): New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis. *Lancet*. 2 (7736), 1225–1227.
3. André, F (2000): Hepatitis B epidemiology in Asia, the Middle East and Africa. *Vaccine*. 18 Suppl 1, 20–22.
4. Arauz-Ruiz, Patricia; Norder, Helene; Robertson, Betty H; et al. (2002): Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *The Journal of general virology*. 83 (Pt 8), 2059–2073.
5. Assad, Safary; Francis, André (1999): Over a decade of experience with a yeast recombinant hepatitis B vaccine. *Vaccine*. 18 (1-2), 57–67.
6. Bauer, Tanja (2003): Untersuchungen zur zellulären Immunantwort nach Impfung gegen das Hepatitis-B-Virus. Dissertation, Universität Regensburg.
7. Bauer, Tanja; Jilg, Wolfgang (2006): Hepatitis B surface antigen-specific T and B cell memory in individuals who had lost protective antibodies after hepatitis B vaccination. *Vaccine*. 24 (5), 572–577.
8. Bavand, M R; Laub, O (1988): Two proteins with reverse transcriptase activities associated with hepatitis B virus-like particles. *Journal of virology*. 62 (2), 626–628.
9. Bayer, M E; Blumberg, B S; Werner, B (1968): Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukaemia, Down's Syndrome and hepatitis. *Nature*. 218 (5146), 1057–1059.
10. Beasley, R P; Lin, C C; Chien, C S; et al. (1982): Geographic distribution of HBsAg carriers in China. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 2 (5), 553–556.
11. Bitter, G A; Egan, K M; Burnette, W N; et al. (1988): Hepatitis B vaccine produced in yeast. *Journal of medical virology*. 25 (2), 123–140.
12. Blumberg, B S; Alter, H J; Visnich, S (1965): A New Antigen in Leukemia Sera. *JAMA: the journal of the American Medical Association*. 191 , 541–546.
13. Blumberg, B S; Gerstley, B J; Hungerford, D A; et al. (1967): A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Annals of internal medicine*. 66 (5), 924–931.
14. De Bruin, W; Leenders, W; Kos, T; et al. (1994): Hepatitis delta virus attaches to human hepatocytes via human liver endonexin II, a specific HBsAg binding protein. *Journal of viral hepatitis*. 1 (1), 33–38.

15. Buti, M; Viladomiu, L; Jardi, R; et al. (1992): Long-term immunogenicity and efficacy of hepatitis B vaccine in hemodialysis patients. *American journal of nephrology*. 12 (3), 144–147.
16. Chang, C; Zhou, S; Ganem, D; et al. (1994): Phenotypic mixing between different hepadnavirus nucleocapsid proteins reveals C protein dimerization to be cis preferential. *Journal of virology*. 68 (8), 5225–5231.
17. Chen, Hong; Deng, Yao; Tan, Wenjie; et al. (2011): Boosting with HBV subunit particle vaccine enhance immune response of novel DNA vaccine consisting of S-PreS1 fusion gene in mice. *Sheng wu gong cheng xue bao = Chinese journal of biotechnology*. 27 (1), 95–100.
18. Chinchai, Teeraporn; Chirathaworn, Chintana; Praianantathavorn, Kesmanee; et al. (2009): Long-term humoral and cellular immune response to hepatitis B vaccine in high-risk children 18-20 years after neonatal immunization. *Viral immunology*. 22 (2), 125–130.
19. Chisari, F V; Ferrari, C (1995): Hepatitis B virus immunopathology. *Springer seminars in immunopathology*. 17 (2-3), 261–281.
20. Chisari, FV (1997): Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. Rizetto M, Purcell RH, Gerin JL, Verme G. *Viral hepatitis and liver disease*. Torino; Edizioni Minerva Medica. 1997, 405–415.
21. Chisari, FV (1999): The immunology of viral hepatitis. *T Cells in the Liver: Biology, Immunopathology and Host Defense*. Crispe, N. (Ed.). Wiley, New York., 117–38.
22. Conway, J F; Cheng, N; Zlotnick, A; et al. (1997): Visualization of a 4-helix bundle in the hepatitis B virus capsid by cryo-electron microscopy. *Nature*. 386 (6620), 91–94.
23. Courouc -Pauty, A M; Plan on, A; Soulier, J P (1983): Distribution of HBsAg subtypes in the world. *Vox sanguinis*. 44 (4), 197–211.
24. Czerkinsky, C C; Nilsson, L A; Nygren, H; et al. (1983): A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *Journal of immunological methods*. 65 (1-2), 109–121.
25. Dane, D S; Cameron, C H; Briggs, M (1970): Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*. 1 (7649), 695–698.
26. Delius, H; Gough, N M; Cameron, C H; et al. (1983): Structure of the hepatitis B virus genome. *Journal of virology*. 47 (2), 337–343.
27. Engvall, E; Perlmann, P (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 8 (9), 871–874.

28. Faruqi, A F; Roychoudhury, S; Greenberg, R; et al. (1991): Replication-defective missense mutations within the terminal protein and spacer/intron regions of the polymerase gene of human hepatitis B virus. *Virology*. 183 (2), 764–768.
29. Feng, Xi; Yan, Hui-Ping; Liao, Hui-Yu; et al. (2012a): The characteristic of T cells response to HBV-specific antigen proteins in patients with HBV infection. *Zhonghua shi yan he lin chuang bing du xue za zhi = Zhonghua shiyan he linchuang bingduxue zazhi = Chinese journal of experimental and clinical virology*. 26 (4), 253–255.
30. Feng, Xia; Yan, Hui-ping; Liao, Hui-yu; et al. (2012b): The impact of antiviral therapy on virus-specific T-cell reactivity in patients with chronic hepatitis B. *Zhonghua yi xue za zhi*. 92 (11), 739–742.
31. Ferrari, C; Penna, A; Bertoletti, A; et al. (1990): Cellular immune response to hepatitis B virus-encoded antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 145 (10), 3442–3449.
32. Fisman, David N.; Agrawal, Deepak; Leder, Karin (2002): Effect of Age on Immunologic Response to Recombinant Hepatitis B Vaccine: A Meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*. 35 (11), 1368–1375.
33. Gabbuti, Andrea; Romanò, Luisa; Blanc, Pierluigi; et al. (2007): Long-term immunogenicity of hepatitis B vaccination in a cohort of Italian healthy adolescents. *Vaccine*. 25 (16), 3129–3132.
34. Galibert, F; Mandart, E; Fitoussi, F; et al. (1979): Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature*. 281 (5733), 646–650.
35. Gallina, A; Gazina, E; Milanesi, G (1995): A C-terminal PreS1 sequence is sufficient to retain hepatitis B virus L protein in 293 cells. *Virology*. 213 (1), 57–69.
36. Ganem, D; Schneider, RJ (2001): Hepadnaviridae: the viruses and their replication. Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields virology*, 4th ed. Vol. 2. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2001, 2923–69.
37. Gerety, R J; Hoofnagle, J H; Norkman, D F; et al. (1975): Hepatitis B surface antigen (HBS Ag) subtypes and indices of clinical disease. *Gastroenterology*. 68 (5 Pt 1), 1253–1260.
38. Gerlich, Wolfram H.; Kann, Michael (2005): Hepatitis B. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Collier, L., Balows, A. Sussmann, M. (Hrsg.). London, U.K.: Edward Ardnold (Publ.) Ltd., 9. Auflage, 1226-1268.

39. Grady, G F; Lee, V A; Prince, A M; et al. (1978): Hepatitis B immune globulin for accidental exposures among medical personnel: final report of a multicenter controlled trial. *The Journal of infectious diseases*. 138 (5), 625–638.
40. Guidotti, L G; Ando, K; Hobbs, M V; et al. (1994): Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91 (9), 3764–3768.
41. Guidotti, L G; McClary, H; Loudis, J M; et al. (2000): Nitric oxide inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice. *The Journal of experimental medicine*. 191 (7), 1247–1252.
42. Guidotti, L. G.; Borrow, P.; Hobbs, M. V.; et al. (1996): Viral cross talk: intracellular inactivation of the hepatitis B virus during an unrelated viral infection of the liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93 (10), 4589–4594.
43. Guirgis, Bassem S.; Abbas, Radwa O.; Azzazy, Hassan M.E. (2010): Hepatitis B virus genotyping: current methods and clinical implications. *International Journal of Infectious Diseases*. 14 (11), 941–953.
44. Harford, N; Cabezon, T; Crabeel, M; et al. (1983): Expression of hepatitis B surface antigen in yeast. *Developments in biological standardization*. 54 , 125–130.
45. Hedley, B. D.; Keeney, M. (2013): Technical issues: flow cytometry and rare event analysis. *International Journal of Laboratory Hematology*. 35 (3), 344–350.
46. Heise, Tilman; Guidotti, Luca G.; Chisari, Francis V. (2001): Characterization of Nuclear RNases That Cleave Hepatitis B Virus RNA near the La Protein Binding Site. *Journal of Virology*. 75 (15), 6874–6883.
47. Hertogs, K; Leenders, W P; Depla, E; et al. (1993): Endonexin II, present on human liver plasma membranes, is a specific binding protein of small hepatitis B virus (HBV) envelope protein. *Virology*. 197 (2), 549–557.
48. Hitzeman, R A; Chen, C Y; Hagie, F E; et al. (1983): Expression of hepatitis B virus surface antigen in yeast. *Nucleic acids research*. 11 (9), 2745–2763.
49. Holton, D (1992): Revised guidelines for booster vaccination against hepatitis B. *CMAJ: Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 147 (7), 1029–1032.
50. Hruska, J F; Clayton, D A; Rubenstein, J L; et al. (1977): Structure of hepatitis B Dane particle DNA before and after the Dane particle DNA polymerase reaction. *Journal of virology*. 21 (2), 666–672.

51. Hu, J; Seeger, C (1996): Hsp90 is required for the activity of a hepatitis B virus reverse transcriptase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93 (3), 1060–1064.
52. Jayalakshmi, MariaKuttikan; Kalyanaraman, Narayanan; Pitchapp, Ramasamy (2013): Hepatitis B Virus Genetic Diversity: Disease Pathogenesis. Rosas-Acosta, German (Hrsg.) *Viral Replication - Chapter 3*. Rijeka, Kroatien: InTech, 1. Auflage, 69-82.
53. Jung, M C; Spengler, U; Schraut, W; et al. (1991): Hepatitis B virus antigen-specific T-cell activation in patients with acute and chronic hepatitis B. *Journal of hepatology*. 13 (3), 310–317.
54. Kajino, K; Jilbert, A R; Saputelli, J; et al. (1994): Woodchuck hepatitis virus infections: very rapid recovery after a prolonged viremia and infection of virtually every hepatocyte.. *Journal of Virology*. 68 (9), 5792–5803.
55. Kann, M; Bischof, A; Gerlich, W H (1997): In vitro model for the nuclear transport of the hepadnavirus genome. *Journal of virology*. 71 (2), 1310–1316.
56. Kann, Michael; Schmitz, Andre; Rabe, Birgit (2007): Intracellular transport of hepatitis B virus. *World journal of gastroenterology: WJG*. 13 (1), 39–47.
57. Kim, Beom Kyung; Revill, Peter A; Ahn, Sang Hoon (2011): HBV genotypes: relevance to natural history, pathogenesis and treatment of chronic hepatitis B. *Antiviral therapy*. 16 (8), 1169–1186.
58. Kramvis, Anna; Arakawa, Kazuko; Yu, Mimi C; et al. (2008): Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. *Journal of medical virology*. 80 (1), 27–46.
59. Krugman, S; Giles, J P (1973): Viral hepatitis, type B (MS-2-strain). Further observations on natural history and prevention. *The New England journal of medicine*. 288 (15), 755–760.
60. Krugman, S; Giles, J P; Hammond, J (1971): Viral hepatitis, type B (MS-2 strain). Studies on active immunization. *JAMA: the journal of the American Medical Association*. 217 (1), 41–45.
61. Krugman, S (1975): Viral hepatitis type B: prospects for active immunization. *Developments in Biological Standardization*. 30 , 363–367.
62. Kurbanov, Fuat; Tanaka, Yasuhito; Mizokami, Masashi (2010): Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. *Hepatology research: the official journal of the Japan Society of Hepatology*. 40 (1), 14–30.

63. Lancet (2000): Are booster immunisations needed for lifelong hepatitis B immunity? European Consensus Group on Hepatitis B Immunity. *Lancet*. 355 (9203), 561–565.
64. Landers, T A; Greenberg, H B; Robinson, W S (1977): Structure of hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction. *Journal of virology*. 23 (2), 368–376.
65. Lürmann (1885): Eine Ikterusepidemie. *Berliner klinische Wochenschrift*. (22), 20–23.
66. MacCallum FO (1947): Homologous serum jaundice. *Lancet*. (2), 691–692.
67. Magnius, L O; Norder, H (1995): Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology*. 38 (1-2), 24–34.
68. Mak, Tak W.; Saunders, Mary (2005): *The Immune Response: Basic and Clinical Principles*. Academic Press. New York, USA: Elsevier, 1. Auflage.
69. Mast, Eric E; Margolis, Harold S; Fiore, Anthony E; et al. (2005): A comprehensive immunization strategy to eliminate transmission of hepatitis B virus infection in the United States: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) part 1: immunization of infants, children, and adolescents. *MMWR. Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports / Centers for Disease Control*. 54 (RR-16), 1–31.
70. McAleer, W J; Buynak, E B; Maigetter, R Z; et al. (1984): Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature*. 307 (5947), 178–180.
71. McLean, A A; Hilleman, M R; McAleer, W J; et al. (1983): Summary of worldwide clinical experience with H-B-Vax (B, MSD). *The Journal of infection*. 7 Suppl 1 , 95–104.
72. Noh, Kyung W; Poland, Gregory A; Murray, Joseph A (2003): Hepatitis B vaccine nonresponse and celiac disease. *The American journal of gastroenterology*. 98 (10), 2289–2292.
73. Norder, H; Hammas, B; Löfdahl, S; et al. (1992): Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *The Journal of general virology*. 73 (Pt 5) , 1201–1208.
74. O'Connor, Thomas G; Winter, Marcia A; Hunn, Julianne; et al. (2013): Prenatal maternal anxiety predicts reduced adaptive immunity in infants. *Brain, behavior, and immunity*. 32, 21-28.

75. Okamoto, H; Tsuda, F; Sakugawa, H; et al. (1988): Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *The Journal of general virology*. 69 (Pt 10) , 2575–2583.
76. Palmović, D; Crnjaković-Palmović, J (1993): Prevention of hepatitis B virus (HBV) infection in health-care workers after accidental exposure: a comparison of two prophylactic schedules. *Infection*. 21 (1), 42–45.
77. Panté, Nelly; Kann, Michael (2002): Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Molecular biology of the cell*. 13 (2), 425–434.
78. Pasek, M; Goto, T; Gilbert, W; et al. (1979): Hepatitis B virus genes and their expression in *E. coli*. *Nature*. 282 (5739), 575–579.
79. Peterson, D L; Paul, D A; Lam, J; et al. (1984): Antigenic structure of hepatitis B surface antigen: identification of the d subtype determinant by chemical modification and use of monoclonal antibodies. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 132 (2), 920–927.
80. Petit, MA; Mabit, H; Duclo-Vallee, C; et al. (1997): Putative cell receptors for hepatitis B virus (HBV). *Gastroenterol Clin Biol*, 21. 1997, 167.
81. Piñól Aguade, J; Mascaro, J M (1971): 2 cases of Gianotti-Crosti syndrome with positive Australian antigen. *Actas dermo-sifiliográficas*. 62 (3), 95–104.
82. Pollack, J R; Ganem, D (1994): Site-specific RNA binding by a hepatitis B virus reverse transcriptase initiates two distinct reactions: RNA packaging and DNA synthesis. *Journal of virology*. 68 (9), 5579–5587.
83. Pontisso, P; Ruvoletto, MG; De Falco, S; et al. (2000): Native hepatitis B virus particles interact with the HBV-binding protein in transfected cells. *Antiviral Therapy*, 5 (1). 2000, 39.
84. Robert Koch-Institut (2011): Zur Situation bei wichtigen Infektionskrankheiten in Deutschland: Virushepatitis B, C und D im Jahr 2010. *Epidemiologisches Bulletin*. (29), 261–274.
85. Robert Koch-Institut (2014): Zur Situation bei wichtigen Infektionskrankheiten in Deutschland: Virushepatitis B und D im Jahr 2013. *Epidemiologisches Bulletin*. (30), 259–274.
86. Robinson, W S; Clayton, D A; Greenman, R L (1974): DNA of a human hepatitis B virus candidate. *Journal of virology*. 14 (2), 384–391.

87. Roome, A J; Walsh, S J; Cartter, M L; et al. (1993): Hepatitis B vaccine responsiveness in Connecticut public safety personnel. *JAMA: the journal of the American Medical Association*. 270 (24), 2931–2934.
88. Schaefer, S; Glebe, D; Gerlich, WH (2010): Hepatitis-B-Virus (Hepadnaviridae). *Medizinische Virologie*. Stuttgart, Deutschland: Thieme Verlag, 2. Auflage, 345–372.
89. Schaefer, Stephan (2007): Hepatitis B virus genotypes in Europe. *Hepatology Research*. 37, 20–26.
90. Sedgwick, J D; Holt, P G (1983): A solid-phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody-secreting cells. *Journal of immunological methods*. 57 (1-3), 301–309.
91. Seeff, L B; Zimmerman, H J; Wright, E C; et al. (1977): A randomized, double blind controlled trial of the efficacy of immune serum globulin for the prevention of post-transfusion hepatitis. A Veterans Administration cooperative study. *Gastroenterology*. 72 (1), 111–121.
92. Seifer, M; Zhou, S; Standring, D N (1993): A micromolar pool of antigenically distinct precursors is required to initiate cooperative assembly of hepatitis B virus capsids in *Xenopus* oocytes. *Journal of virology*. 67 (1), 249–257.
93. Sninsky, J J; Siddiqui, A; Robinson, W S; et al. (1979): Cloning and endonuclease mapping of the hepatitis B viral genome. *Nature*. 279 (5711), 346–348.
94. Stevens, C E; Toy, P T; Tong, M J; et al. (1985): Perinatal hepatitis B virus transmission in the United States. Prevention by passive-active immunization. *JAMA: the journal of the American Medical Association*. 253 (12), 1740–1745.
95. Struve, J; Aronsson, B; Frenning, B; et al. (1992): Intramuscular versus intradermal administration of a recombinant hepatitis B vaccine: a comparison of response rates and analysis of factors influencing the antibody response. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 24 (4), 423–429.
96. Stuyver, L; De Gendt, S; Van Geyt, C; et al. (2000): A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *The Journal of general virology*. 81 (Pt 1), 67–74.
97. Summers, J; O’Connell, A; Millman, I (1975): Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 72 (11), 4597–4601.

98. Swain, Susan L. (2000): CD4 T-cell memory can persist in the absence of class II. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences.* 355 (1395), 407–411.
99. Takahashi, K; Machida, A; Funatsu, G; et al. (1983): Immunochemical structure of hepatitis B e antigen in the serum. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950).* 130 (6), 2903–2907.
100. Tanaka, J (2000): Hepatitis B epidemiology in Latin America. *Vaccine.* 18 Suppl 1, 17–19.
101. Terrault, Norah A; Vyas, Girish (2003): Hepatitis B immune globulin preparations and use in liver transplantation. *Clinics in liver disease.* 7 (3), 537–550.
102. Thimme, Robert; Wieland, Stefan; Steiger, Carola; et al. (2003): CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *Journal of virology.* 77 (1), 68–76.
103. Thung, S N; Gerber, M A (1984): Polyalbumin receptors: their role in the attachment of hepatitis B virus to hepatocytes. *Seminars in liver disease.* 4 (1), 69–75.
104. Tiollais, P; Charnay, P; Vyas, G N (1981): Biology of hepatitis B virus. *Science (New York, N.Y.).* 213 (4506), 406–411.
105. Tiollais, P; Pourcel, C; Dejean, A (1985): The hepatitis B virus. *Nature.* 317 (6037), 489–495.
106. Toda, G (1999): Gianotti-Crosti syndrome and Gianotti disease. *Ryōikibetsu shōkōgun shirīzu.* (24 Pt 2), 137–140.
107. Treichel, U; Meyer zum Büschenfelde, K H; Dienes, H P; et al. (1997): Receptor-mediated entry of hepatitis B virus particles into liver cells. *Archives of virology.* 142 (3), 493–498.
108. Tsukamoto, Hirotake; Clise-Dwyer, Karen; Huston, Gail E.; et al. (2009): Age-associated increase in lifespan of na⁺ve CD4 T cells contributes to T-cell homeostasis but facilitates development of functional defects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 106 (43), 18333–18338.
109. Tsukamoto, Hirotake; Huston, Gail E.; Dibble, John; et al. (2010): Bim Dictates Naive CD4 T Cell Lifespan and the Development of Age-Associated Functional Defects. *The Journal of Immunology.* 185 (8), 4535–4544.
110. Tuttleman, J S; Pourcel, C; Summers, J (1986): Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell.* 47 (3), 451–460.

111. Valenzuela, P; Gray, P; Quiroga, M; et al. (1979): Nucleotide sequence of the gene coding for the major protein of hepatitis B virus surface antigen. *Nature*. 280 (5725), 815–819.
112. Valenzuela, P; Medina, A; Rutter, W J; et al. (1982): Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature*. 298 (5872), 347–350.
113. Venters, Charmaine; Graham, William; Cassidy, William (2004): Recombivax-HB: perspectives past, present and future. *Expert review of vaccines*. 3 (2), 119–129.
114. Vento, S; Rondanelli, E G; Ranieri, S; et al. (1987): Prospective study of cellular immunity to hepatitis-B-virus antigens from the early incubation phase of acute hepatitis B. *Lancet*. 2 (8551), 119–122.
115. Wang, Juan; Wu, Gang; Zhao, Li; et al. (2011a): Establishment of cellular immunity of enhanced hepatitis B vaccine. *Zhonghua shi yan he lin chuang bing du xue za zhi = Zhonghua shiyan he linchuang bingduxue zazhi = Chinese journal of experimental and clinical virology*. 25 (4), 310–312.
116. Wang, Li-Yu; Lin, Hans Hsienhong (2007): Ethnicity, substance use, and response to booster hepatitis B vaccination in anti-HBs-seronegative adolescents who had received primary infantile vaccination. *Journal of hepatology*. 46 (6), 1018–1025.
117. Wang, Yanzhong; Wang, Saifeng; Zhang, Xiaojun; et al. (2011b): Enhancement of cellular and humoral immune responses of HBV DNA vaccine by HSP70 and gp96. *Sheng wu gong cheng xue bao = Chinese journal of biotechnology*. 27 (5), 790–798.
118. Webster, G J; Reignat, S; Maini, M K; et al. (2000): Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanisms. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 32 (5), 1117–1124.
119. Van Weemen, B.K.; Schuurs, A.H.W.M. (1971): Immunoassay using antigen—enzyme conjugates. *FEBS Letters*. 15 (3), 232–236.
120. Weihrauch, Martin R; von Bergwelt-Baildon, Michael; Kandic, Milos; et al. (2008): T cell responses to hepatitis B surface antigen are detectable in non-vaccinated individuals. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 14 (16), 2529–2533.
121. Weinbaum, Cindy M.; Williams, Ian; Mast, Eric E.; et al. (2008): Recommendations for Identification and Public Health Management of Persons with Chronic Hepatitis B Virus Infection. *CDC - Morbidity and Mortality Weekly Report*. 57. Aufl. 19.9.2008, 1–20.
122. West, D J (1989): Clinical experience with hepatitis B vaccines. *American journal of infection control*. 17 (3), 172–180.

123. West, D J; Calandra, G B; Hesley, T M; et al. (1993): Control of hepatitis B through routine immunization of infants: the need for flexible schedules and new combination vaccine formulations. *Vaccine*. 11 Suppl 1 , 21–27.
124. Will, H.; Reiser, W.; Weimer, T.; et al. (1987): Replication strategy of human hepatitis B virus.. *Journal of Virology*. 61 (3), 904–911.
125. Wismans, P.J.; van Hattum, J.; Mudde, G.C.; et al. (1989): Is booster injection with hepatitis B vaccine necessary in healthy responders?: A study of the immune response. *Journal of Hepatology*. 8 (2), 236–240.
126. Xu, Z Y; Liu, C B; Francis, D P; et al. (1985): Prevention of perinatal acquisition of hepatitis B virus carriage using vaccine: preliminary report of a randomized, double-blind placebo-controlled and comparative trial. *Pediatrics*. 76 (5), 713–718.
127. Yang, Yong-Lin; Huang, Zu-Hu; Cai, Xu-Bing; et al. (2012): Humoral and cellular immune responses to HBV in the blood donors. *Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi* = Chinese journal of cellular and molecular immunology. 28 (4), 404–406.
128. Zhang, Wei; Han, Li-li; Lin, Chang-ying; et al. (2010): Study on the cellular and humoral immunity effect of recombinant Chinese hamster ovary cell hepatitis B vaccine in adults. *Zhonghua yu fang yi xue za zhi* [Chinese journal of preventive medicine]. 44 (10), 918–922.
129. Zhou, S; Yang, S Q; Standring, D N (1992): Characterization of hepatitis B virus capsid particle assembly in *Xenopus* oocytes. *Journal of virology*. 66 (5), 3086–3092.
130. Zoulim, F; Saputelli, J; Seeger, C (1994): Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo. *Journal of virology*. 68 (3), 2026–2030.
131. Zuckerman, Arie J.; Thomas, Howard C.; Lemon, Stanley M. (2005): *Viral Hepatitis*. Revised. Hoboken, USA: Blackwell Publ., 3. Auflage.

7. Anhang

7.1. Patienteninformation

PATIENTENINFORMATION

Sehr geehrter Patient, sehr geehrte Patientin,

mein Name ist Thomas Zeuner und ich studiere an der Universität Leipzig Humanmedizin. Ich schreibe derzeit meine Doktorarbeit mit dem Thema:

„Zelluläre Immunität bei Hepatitis B“

am Institut für Klinische Immunologie unter der Betreuung von Herrn Professor Doktor Ulrich Sack.

Im Zuge dieser Doktorarbeit untersuche ich verschiedene Nachweismethoden zur Überprüfung des Impferfolges von Hepatitis B.

Dies kann nur durch eine Blutuntersuchung erfolgen. Aus diesem Grunde ist es nötig zwei kleine Röhrchen Blut (je 4,5 ml) bei Ihnen abzunehmen.

Die venöse Blutentnahme kann in sehr seltenen Fällen zur Bildung eines kleinen blauen Flecks, einer örtlichen oder allgemeinen Entzündung führen.

Die Teilnahme an dieser Studie ist vollkommen freiwillig. Sie gehen mit Ihrer Einwilligungserklärung keine Verpflichtungen irgendeiner Art ein. Natürlich können Sie jederzeit ohne Nennung von Gründen Ihre Zusammenarbeit mit uns beenden, ohne dass für Sie daraus Nachteile resultieren.

Natürlich werden die Ergebnisse des Immunitätstests Ihrer behandelten Ärztin mitgeteilt, die Sie dann darüber informieren wird.

Sollten bei Ihnen noch Fragen offen bleiben, kann Frau Dr. Claudia Schramek diese an mich weiterleiten und ich stehe Ihnen dann gern zur Beantwortung dieser zur Verfügung.

EINWILLIGUNGSERKLÄRUNG

Name:

Vorname:

Geburtsdatum:

Hepatitis B-Impfung: ja / nein → Datum:

Hiermit erkläre ich mich mit der Teilnahme an der Studie zur Untersuchung der zellulären Immunität bei Hepatitis B einverstanden.

Ich wurde über die möglichen Risiken der venösen Blutabnahme aufgeklärt. Alle meine diesbezüglichen Fragen wurden beantwortet.

Ich bin darauf hingewiesen worden, dass meine persönlichen Daten nicht an Dritte weitergegeben werden und ausschließlich zur Datenerhebung im Zuge der Doktorarbeit von Herrn Thomas Zeuner dienen. Es wird keine namentliche Nennung erfolgen.

Die Einwilligung kann jederzeit widerrufen werden, ohne dass mir daraus Nachteile entstehen.

☐ einverstanden

☐ nicht einverstanden

Datum, Unterschrift des Patienten

7.2. Messwerte – ELISA und ELISpot

ELISA – Versuchsreihe 1:

Patient	Extinktion - V1	Extinktion korrigiert - V1	Antikörper- konzentration in U/l	Endergebnis in U/l
2	0,109	0,110929204	5,45216	negativ
3	1,814	1,846106195	127,46	127,46
5	0,078	0,079380531	3,984	negativ
6	0,095	0,096681416	4,786	negativ
8	0,088	0,089557522	4,455	negativ
9	0,084	0,085486726	4,266	negativ
10	0,091	0,092610619	4,597	negativ
11	0,915	0,93119469	53,94	53,94
12	0,088	0,089557522	4,455	negativ
13	0,089	0,090575221	4,502	negativ
14	0,107	0,108893805	5,357	negativ
15	1,228	1,249734513	77,445	77,445
16	0,113	0,115	5,643	negativ
17	1,875	1,908185841	133,091	133,091
19	0,119	0,121106195	5,931	negativ
20	0,127	0,129247788	6,317	negativ
24	0,111	0,112964602	5,548	negativ
25	0,11	0,111946903	5,5	negativ
26	0,119	0,121106195	5,931	negativ
28	0,122	0,124159292	6,076	negativ
29	0,101	0,102787611	5,071	negativ
30	0,12	0,122123894	5,98	negativ
31	0,402	0,409115044	20,847	20,847
34	0,187	0,190309735	9,274	9,274
39	0,948	0,964778761	56,306	56,306
40	0,135	0,137389381	6,704	negativ
46	0,129	0,131283186	6,41	negativ
47	0,246	0,250353982	12,3	12,3
48	0,131	0,133318584	6,51	negativ
52	0,933	0,949513274	55,227	55,227
53	1,89	1,923451327	134,488	134,488
54	0,259	0,263584071	12,982	12,982
57	0,207	0,210663717	10,287	10,287
58	0,1	0,101769912	5,023	negativ
63	0,148	0,150619469	7,338	negativ
65	0,131	0,133318584	6,51	negativ
66	0,121	0,123141593	6,03	negativ

68	0,469	0,477300885	24,75	24,75
69	0,126	0,128230088	6,27	negativ
71	1,337	1,360663717	86,17	86,17
73	0,33	0,335840708	16,806	16,806
75	0,851	0,866061947	49,428	49,428
77	0,128	0,130265487	6,365	negativ
78	0,115	0,117035398	5,739	negativ
79	0,17	0,17300885	8,424	8,424
80	0,133	0,135353982	6,607	negativ
81	0,126	0,128230088	6,27	negativ
82	0,171	0,174026549	8,474	8,474
83	0,133	0,135353982	6,607	negativ
85	0,127	0,129247788	6,317	negativ
86	0,181	0,18420354	8,973	8,973
87	0,143	0,145530973	7,094	negativ
88	0,135	0,137389381	6,704	negativ
89	0,99	1,007522124	59,357	59,357

ELISA - Versuchsreihe 2:

Patient	Extinktion V2	Extinktion korrigiert - V2	Antikörper- konzentration in U/l	Endergebnis in U/l
1	1,497	1,663993648	108,07	108,1
4	0,518	0,575784041	29,36	29,36
7	1,473	1,637316395	105,8	105,8
18	0,841	0,934815403	52,22	52,22
21	4	4,446208812	418,48	418,5
22	0,458	0,509090909	25,49	25,49
23	2,083	2,315363239	167,55	167,6
27	3,996	4,441762603	417,87	417,9
32	0,3	0,333465661	15,91	15,9
33	3,823	4,249464072	391,88	391,9
35	0,096	0,106709011	4,97	negativ
36	4	4,446208812	418,48	418,5
37	1,956	2,174196109	153,93	153,9
38	0,078	0,086701072	4,09	negativ
41	0,955	1,061532354	61,05	61,1
42	4	4,446208812	418,48	418,5
43	0,067	0,074473998	3,55	negativ
44	0,928	1,031520444	58,93	58,9
45	0,069	0,076697102	3,65	negativ
49	0,081	0,090035728	4,23	negativ
50	0,32	0,355696705	17,07	17,1
51	1,416	1,573957919	100,54	100,5
55	0,558	0,620246129	32	32
56	0,105	0,116712981	5,42	negativ
64	4	4,446208812	418,48	418,5
67	0,564	0,626915442	32,41	32,4
70	3,184	3,539182214	301,54	301,5
72	0,45	0,500198491	24,98	25
74	3,837	4,265025803	393,96	394
76	0,176	0,195633188	9,06	9,06
84	0,078	0,086701072	4,086	negativ
90	0,512	0,569114728	28,96	29

ELISpot: (Anzahl der Spots)**Vorversuche Platte 1 – 12 h Inkubation:**

	Lw	PHA	ESAT6	HepB100	HepB200	HepB50	HepB25
BC1	112,5	586	102	66,5	79,5	87,5	65
BC2	45	652,5	47,5	29,5	29,5	44	33,5

Vorversuche Platte 2 – 12 h Inkubation:

	Lw	PHA	ESAT6	HepB100	HepB200	HepB50	HepB25
BC1	32,5	470,5	96	73	64	62,5	67
BC2	35	621	44	37,5	31	37,5	41

Vorversuche Platte 1 – 24 h Inkubation:

	Lw	PHA	HepB100	HepB50	HepB25	Tetanus	CMV	Diph
BC1	141	647	110,5	119	113,5	94,5	131	74,5
BC2	271	450	182	190	197	238	258,5	78,5

Vorversuche Platte 2 – 24 h Inkubation:

	Lw	PHA	HepB100	HepB50	HepB25	Tetanus	CMV	Diph
BC1	102,5	603	103,5	94,5	96,5	94	107,5	50,5
BC2	197	464	187,5	235,5	168	160,5	206,5	102,5

ELISpot - Antigen 1:

Patient	Lw - 1	PHA - 1	Ag 1 - 1	Lw - 2	PHA - 2	Ag 1 - 2
01 Spots	21	689	20	30	639	8
01 Aktivität	<u>221</u>	<u>15300</u>	<u>187</u>	<u>186</u>	<u>13735</u>	<u>123</u>
02 Spots	29	597	22	31	655	22
02 Aktivität	<u>193</u>	<u>12554</u>	<u>228</u>	<u>371</u>	<u>13955</u>	<u>124</u>
03 Spots	28	652	5	16	676	20
03 Aktivität	<u>334</u>	<u>11078</u>	<u>50</u>	<u>174</u>	<u>14595</u>	<u>133</u>
04 Spots	17	779	28	23	847	18
04 Aktivität	<u>153</u>	<u>16568</u>	<u>367</u>	<u>169</u>	<u>17675</u>	<u>252</u>
05 Spots	14	524	16	10	635	15
05 Aktivität	<u>119</u>	<u>9554</u>	<u>237</u>	<u>78</u>	<u>12132</u>	<u>101</u>
06 Spots	15	797	13	20	790	8
06 Aktivität	<u>185</u>	<u>13001</u>	<u>205</u>	<u>155</u>	<u>14442</u>	<u>49</u>
07 Spots	18	626	16	11	672	16
07 Aktivität	<u>126</u>	<u>13282</u>	<u>157</u>	<u>267</u>	<u>14372</u>	<u>114</u>
08 Spots	17	494	10	16	521	14
08 Aktivität	<u>166</u>	<u>8122</u>	<u>122</u>	<u>233</u>	<u>8519</u>	<u>120</u>
09 Spots	18	751	28	25	743	23
09 Aktivität	<u>219</u>	<u>15701</u>	<u>179</u>	<u>245</u>	<u>14807</u>	<u>293</u>
10 Spots	22	927	37	13	827	19
10 Aktivität	<u>280</u>	<u>14803</u>	<u>411</u>	<u>105</u>	<u>12502</u>	<u>171</u>
11 Spots	98	622	137	96	658	138
11 Aktivität	<u>1645</u>	<u>11896</u>	<u>2274</u>	<u>1613</u>	<u>12984</u>	<u>2369</u>
12 Spots	14	659	8	11	651	21
12 Aktivität	<u>81</u>	<u>14048</u>	<u>43</u>	<u>121</u>	<u>13391</u>	<u>253</u>
13 Spots	24	804	22	26	735	20
13 Aktivität	<u>268</u>	<u>13891</u>	<u>168</u>	<u>379</u>	<u>12504</u>	<u>144</u>
14 Spots	5	287	3	20	257	5
14 Aktivität	<u>43</u>	<u>4399</u>	<u>18</u>	<u>301</u>	<u>3748</u>	<u>115</u>
15 Spots	16	633	17	27	696	14
15 Aktivität	<u>95</u>	<u>9892</u>	<u>125</u>	<u>328</u>	<u>11718</u>	<u>88</u>
16 Spots	10	517	11	12	523	14
16 Aktivität	<u>81</u>	<u>11508</u>	<u>83</u>	<u>134</u>	<u>11983</u>	<u>94</u>
17 Spots	25	683	19	22	716	14
17 Aktivität	<u>173</u>	<u>11044</u>	<u>105</u>	<u>158</u>	<u>11165</u>	<u>78</u>
18 Spots	9	495	16	18	493	10
18 Aktivität	<u>79</u>	<u>11244</u>	<u>191</u>	<u>219</u>	<u>10707</u>	<u>98</u>
19 Spots	32	798	20	25	775	18
19 Aktivität	<u>507</u>	<u>17492</u>	<u>170</u>	<u>375</u>	<u>17632</u>	<u>144</u>
20 Spots	119	700	135	140	701	147
20 Aktivität	<u>3367</u>	<u>12075</u>	<u>3300</u>	<u>3429</u>	<u>11876</u>	<u>3885</u>

21 Spots	22	492	30	17	689	24
21 Aktivität	<u>269</u>	<u>9224</u>	<u>364</u>	<u>159</u>	<u>13086</u>	<u>243</u>
22 Spots	2	334	4	4	312	5
22 Aktivität	<u>8</u>	<u>4979</u>	<u>31</u>	<u>23</u>	<u>5404</u>	<u>38</u>
23 Spots	25	606	24	32	708	29
23 Aktivität	<u>238</u>	<u>12741</u>	<u>243</u>	<u>229</u>	<u>16277</u>	<u>291</u>
24 Spots	26	886	24	28	828	27
24 Aktivität	<u>419</u>	<u>14832</u>	<u>347</u>	<u>245</u>	<u>14587</u>	<u>398</u>
25 Spots	10	687	14	5	683	4
25 Aktivität	<u>65</u>	<u>14012</u>	<u>142</u>	<u>15</u>	<u>13650</u>	<u>19</u>
26 Spots	21	743	23	10	755	21
26 Aktivität	<u>148</u>	<u>15427</u>	<u>203</u>	<u>42</u>	<u>16323</u>	<u>146</u>
27 Spots	11	613	11	8	601	7
27 Aktivität	<u>116</u>	<u>12582</u>	<u>108</u>	<u>43</u>	<u>12671</u>	<u>46</u>
28 Spots	14	747	19	14	772	13
28 Aktivität	<u>107</u>	<u>16292</u>	<u>149</u>	<u>63</u>	<u>15993</u>	<u>62</u>
29 Spots	21	741	7	6	742	8
29 Aktivität	<u>521</u>	<u>15243</u>	<u>30</u>	<u>47</u>	<u>15840</u>	<u>52</u>
30 Spots	5	582	6	10	541	6
30 Aktivität	<u>48</u>	<u>11541</u>	<u>52</u>	<u>105</u>	<u>10444</u>	<u>79</u>
31 Spots	4	775	10	25	822	12
31 Aktivität	<u>43</u>	<u>13624</u>	<u>104</u>	<u>317</u>	<u>13908</u>	<u>171</u>
32 Spots	6	613	5	7	551	5
32 Aktivität	<u>55</u>	<u>10021</u>	<u>23</u>	<u>61</u>	<u>8968</u>	<u>26</u>
33 Spots	3	116	3	3	139	4
33 Aktivität	<u>44</u>	<u>1259</u>	<u>20</u>	<u>31</u>	<u>1888</u>	<u>20</u>
34 Spots	14	781	9	15	834	10
34 Aktivität	<u>154</u>	<u>12951</u>	<u>71</u>	<u>116</u>	<u>14187</u>	<u>93</u>
35 Spots	6	698	40	4	683	13
35 Aktivität	<u>26</u>	<u>9915</u>	<u>456</u>	<u>57</u>	<u>9096</u>	<u>273</u>
36 Spots	5	630	4	5	615	5
36 Aktivität	<u>80</u>	<u>10904</u>	<u>127</u>	<u>67</u>	<u>10490</u>	<u>59</u>
37 Spots	12	755	9	8	730	10
37 Aktivität	<u>69</u>	<u>14024</u>	<u>70</u>	<u>89</u>	<u>14271</u>	<u>69</u>
38 Spots	14	860	12	12	864	17
38 Aktivität	<u>119</u>	<u>14332</u>	<u>132</u>	<u>189</u>	<u>14252</u>	<u>147</u>
39 Spots	13	438	21	9	328	15
39 Aktivität	<u>217</u>	<u>10190</u>	<u>274</u>	<u>112</u>	<u>8000</u>	<u>383</u>
40 Spots	70	57	63	75	219	61
40 Aktivität	<u>818</u>	<u>923</u>	<u>560</u>	<u>836</u>	<u>3737</u>	<u>576</u>
41 Spots	14	617	28	23	590	27
41 Aktivität	<u>116</u>	<u>14076</u>	<u>369</u>	<u>292</u>	<u>13625</u>	<u>240</u>
42 Spots	26	393	14	17	302	10

42 Aktivität	<u>416</u>	<u>11858</u>	<u>188</u>	<u>328</u>	<u>8709</u>	<u>110</u>
43 Spots	14	34	8	6	17	13
43 Aktivität	<u>61</u>	<u>474</u>	<u>128</u>	<u>47</u>	<u>231</u>	<u>156</u>
44 Spots	71	41	56	50	34	38
44 Aktivität	<u>1196</u>	<u>639</u>	<u>591</u>	<u>485</u>	<u>555</u>	<u>576</u>
45 Spots	5	371	14	6	38	5
45 Aktivität	<u>93</u>	<u>7573</u>	<u>82</u>	<u>235</u>	<u>1182</u>	<u>100</u>
46 Spots	14	5	5	14	6	11
46 Aktivität	<u>210</u>	<u>129</u>	<u>62</u>	<u>356</u>	<u>145</u>	<u>216</u>
47 Spots	18	207	34	19	132	31
47 Aktivität	<u>212</u>	<u>4464</u>	<u>437</u>	<u>200</u>	<u>2545</u>	<u>521</u>
48 Spots	2	519	3	15	538	4
48 Aktivität	<u>6</u>	<u>12917</u>	<u>16</u>	<u>131</u>	<u>12247</u>	<u>22</u>
49 Spots	11	183	14	6	39	8
49 Aktivität	<u>79</u>	<u>3277</u>	<u>208</u>	<u>55</u>	<u>1298</u>	<u>178</u>
50 Spots	17	15	23	12	51	29
50 Aktivität	<u>248</u>	<u>451</u>	<u>468</u>	<u>144</u>	<u>1735</u>	<u>856</u>
67 Spots	11	552	12	32	520	11
67 Aktivität	<u>115</u>	<u>14235</u>	<u>176</u>	<u>324</u>	<u>13752</u>	<u>103</u>
68 Spots	33	293	13	15	341	16
68 Aktivität	<u>526</u>	<u>5509</u>	<u>147</u>	<u>85</u>	<u>7747</u>	<u>137</u>
69 Spots	16	540	24	14	562	10
69 Aktivität	<u>313</u>	<u>14422</u>	<u>311</u>	<u>334</u>	<u>16237</u>	<u>213</u>
70 Spots	11	562	9	12	564	17
70 Aktivität	<u>126</u>	<u>16062</u>	<u>68</u>	<u>136</u>	<u>17048</u>	<u>179</u>
71 Spots	13	573	10	18	606	7
71 Aktivität	<u>153</u>	<u>14026</u>	<u>152</u>	<u>174</u>	<u>14820</u>	<u>102</u>
72 Spots	57	582	58	49	679	40
72 Aktivität	<u>599</u>	<u>12893</u>	<u>585</u>	<u>540</u>	<u>16257</u>	<u>328</u>
73 Spots	19	574	20	14	587	15
73 Aktivität	<u>164</u>	<u>14583</u>	<u>256</u>	<u>138</u>	<u>16578</u>	<u>226</u>
74 Spots	19	579	19	19	431	21
74 Aktivität	<u>261</u>	<u>16121</u>	<u>221</u>	<u>309</u>	<u>11082</u>	<u>239</u>
75 Spots	11	397	11	21	471	19
75 Aktivität	<u>133</u>	<u>11539</u>	<u>94</u>	<u>175</u>	<u>14246</u>	<u>293</u>
76 Spots	3	448	5	2	499	6
76 Aktivität	<u>19</u>	<u>9311</u>	<u>99</u>	<u>6</u>	<u>12369</u>	<u>97</u>
77 Spots	639	595	729	700	555	707
77 Aktivität	<u>6854</u>	<u>10165</u>	<u>9932</u>	<u>8853</u>	<u>11931</u>	<u>9670</u>
78 Spots	31	347	36	34	387	31
78 Aktivität	<u>376</u>	<u>8096</u>	<u>242</u>	<u>352</u>	<u>10715</u>	<u>189</u>
79 Spots	13	614	4	7	599	8
79 Aktivität	<u>218</u>	<u>15835</u>	<u>68</u>	<u>86</u>	<u>12670</u>	<u>173</u>

80 Spots	65	64	85	131	80	82
80 Aktivität	<u>587</u>	<u>915</u>	<u>849</u>	<u>1146</u>	<u>1069</u>	<u>1040</u>
81 Spots	8	600	12	14	608	6
81 Aktivität	<u>199</u>	<u>13193</u>	<u>74</u>	<u>180</u>	<u>14100</u>	<u>79</u>
82 Spots	335	736	306	275	666	293
82 Aktivität	<u>5367</u>	<u>17039</u>	<u>4431</u>	<u>4651</u>	<u>15731</u>	<u>5353</u>
83 Spots	163	221	108	129	118	63
83 Aktivität	<u>4500</u>	<u>3491</u>	<u>2423</u>	<u>2746</u>	<u>1947</u>	<u>1316</u>
84 Spots	30	585	39	32	521	37
84 Aktivität	<u>384</u>	<u>9003</u>	<u>385</u>	<u>486</u>	<u>7965</u>	<u>731</u>
85 Spots	45	266	33	40	287	33
85 Aktivität	<u>814</u>	<u>4612</u>	<u>536</u>	<u>528</u>	<u>4713</u>	<u>406</u>
86 Spots	37	246	35	52	339	21
86 Aktivität	<u>559</u>	<u>3485</u>	<u>537</u>	<u>1178</u>	<u>5513</u>	<u>322</u>
87 Spots	118	607	85	112	581	65
87 Aktivität	<u>2777</u>	<u>9120</u>	<u>2093</u>	<u>2122</u>	<u>8704</u>	<u>1303</u>
88 Spots	75	519	17	97	583	20
88 Aktivität	<u>1782</u>	<u>9838</u>	<u>301</u>	<u>2172</u>	<u>10950</u>	<u>285</u>
89 Spots	437	3	461	475	4	480
89 Aktivität	<u>9286</u>	<u>24</u>	<u>9805</u>	<u>9841</u>	<u>64</u>	<u>9378</u>
90 Spots	218	126	157	240	224	167
90 Aktivität	<u>3560</u>	<u>1722</u>	<u>3280</u>	<u>4597</u>	<u>3819</u>	<u>4127</u>

ELISpot - Antigen 2:

Patient	Lw - 1	PHA - 1	Ag 2 - 1	Lw 2	PHA 2	Ag 2 - 2
27 Spots	11	613	7	8	601	12
27 Aktivität	<u>116</u>	<u>12582</u>	<u>39</u>	<u>43</u>	<u>12671</u>	<u>110</u>
28 Spots	14	747	6	14	772	6
28 Aktivität	<u>107</u>	<u>16292</u>	<u>27</u>	<u>63</u>	<u>15993</u>	<u>24</u>
29 Spots	21	741	4	6	742	7
29 Aktivität	<u>521</u>	<u>15243</u>	<u>30</u>	<u>47</u>	<u>15840</u>	<u>64</u>
30 Spots	5	582	3	10	541	5
30 Aktivität	<u>48</u>	<u>11541</u>	<u>14</u>	<u>105</u>	<u>10444</u>	<u>31</u>
31 Spots	4	775	14	25	822	13
31 Aktivität	<u>43</u>	<u>13624</u>	<u>103</u>	<u>317</u>	<u>13908</u>	<u>128</u>
32 Spots	6	613	4	7	551	1
32 Aktivität	<u>55</u>	<u>10021</u>	<u>65</u>	<u>61</u>	<u>8968</u>	<u>3</u>
33 Spots	3	116	8	3	139	4
33 Aktivität	<u>44</u>	<u>1259</u>	<u>120</u>	<u>31</u>	<u>1888</u>	<u>20</u>
34 Spots	14	781	7	15	834	10
34 Aktivität	<u>154</u>	<u>12951</u>	<u>56</u>	<u>116</u>	<u>14187</u>	<u>190</u>
35 Spots	6	698	44	4	683	12
35 Aktivität	<u>26</u>	<u>9915</u>	<u>468</u>	<u>57</u>	<u>9096</u>	<u>73</u>
36 Spots	5	630	3	5	615	1
36 Aktivität	<u>80</u>	<u>10904</u>	<u>14</u>	<u>67</u>	<u>10490</u>	<u>5</u>
37 Spots	12	755	19	8	730	15
37 Aktivität	<u>69</u>	<u>14024</u>	<u>109</u>	<u>89</u>	<u>14271</u>	<u>110</u>
38 Spots	14	860	11	12	864	11
38 Aktivität	<u>119</u>	<u>14332</u>	<u>96</u>	<u>189</u>	<u>14252</u>	<u>115</u>
39 Spots	13	438	16	9	328	15
39 Aktivität	<u>217</u>	<u>10190</u>	<u>548</u>	<u>112</u>	<u>8000</u>	<u>232</u>
40 Spots	70	57	59	75	219	53
40 Aktivität	<u>818</u>	<u>923</u>	<u>476</u>	<u>836</u>	<u>3737</u>	<u>407</u>
41 Spots	14	617	27	23	590	32
41 Aktivität	<u>116</u>	<u>14076</u>	<u>227</u>	<u>292</u>	<u>13625</u>	<u>265</u>
42 Spots	26	393	15	17	302	13
42 Aktivität	<u>416</u>	<u>11858</u>	<u>288</u>	<u>328</u>	<u>8709</u>	<u>204</u>
43 Spots	14	34	52	6	17	25
43 Aktivität	<u>61</u>	<u>474</u>	<u>749</u>	<u>47</u>	<u>231</u>	<u>448</u>
44 Spots	71	41	80	50	34	63
44 Aktivität	<u>1196</u>	<u>639</u>	<u>1681</u>	<u>485</u>	<u>555</u>	<u>1513</u>
45 Spots	5	371	4	6	38	6
45 Aktivität	<u>93</u>	<u>7573</u>	<u>69</u>	<u>235</u>	<u>1182</u>	<u>79</u>
46 Spots	14	5	4	14	6	12

46 Aktivität	<u>210</u>	<u>129</u>	<u>33</u>	<u>356</u>	<u>145</u>	<u>286</u>
47 Spots	18	207	27	19	132	39
47 Aktivität	<u>212</u>	<u>4464</u>	<u>479</u>	<u>200</u>	<u>2545</u>	<u>519</u>
48 Spots	2	519	4	15	538	6
48 Aktivität	<u>6</u>	<u>12917</u>	<u>64</u>	<u>131</u>	<u>12247</u>	<u>65</u>
49 Spots	11	183	11	6	39	6
49 Aktivität	<u>79</u>	<u>3277</u>	<u>79</u>	<u>55</u>	<u>1298</u>	<u>87</u>
50 Spots	17	15	17	12	51	34
50 Aktivität	<u>248</u>	<u>451</u>	<u>432</u>	<u>144</u>	<u>1735</u>	<u>778</u>
51 Spots	33	217	51	24	229	30
51 Aktivität	<u>245</u>	<u>4781</u>	<u>913</u>	<u>141</u>	<u>4452</u>	<u>406</u>
52 Spots	5	554	12	9	567	22
52 Aktivität	<u>55</u>	<u>14683</u>	<u>114</u>	<u>100</u>	<u>13735</u>	<u>336</u>
53 Spots	18	186	38	26	454	32
53 Aktivität	<u>227</u>	<u>3001</u>	<u>497</u>	<u>284</u>	<u>8550</u>	<u>434</u>
54 Spots	2	4	13	3	1	8
54 Aktivität	<u>25</u>	<u>61</u>	<u>79</u>	<u>83</u>	<u>89</u>	<u>93</u>
55 Spots	19	598	22	129	600	33
55 Aktivität	<u>270</u>	<u>14545</u>	<u>359</u>	<u>2580</u>	<u>13203</u>	<u>660</u>
56 Spots	43	96	11	11	233	17
56 Aktivität	<u>627</u>	<u>1668</u>	<u>111</u>	<u>75</u>	<u>4207</u>	<u>150</u>
57 Spots	19	597	34	36	568	38
57 Aktivität	<u>123</u>	<u>13283</u>	<u>273</u>	<u>471</u>	<u>14546</u>	<u>357</u>
58 Spots	20	521	46	31	505	55
58 Aktivität	<u>153</u>	<u>13039</u>	<u>738</u>	<u>380</u>	<u>12441</u>	<u>824</u>
63 Spots	18	240	29	21	136	195
63 Aktivität	<u>258</u>	<u>4212</u>	<u>532</u>	<u>87</u>	<u>2152</u>	<u>3215</u>
64 Spots	8	215	31	9	159	17
64 Aktivität	<u>238</u>	<u>3884</u>	<u>491</u>	<u>106</u>	<u>2728</u>	<u>306</u>
65 Spots	10	608	26	12	631	27
65 Aktivität	<u>62</u>	<u>13628</u>	<u>442</u>	<u>268</u>	<u>14323</u>	<u>841</u>
66 Spots	26	495	62	45	598	74
66 Aktivität	<u>238</u>	<u>10369</u>	<u>859</u>	<u>544</u>	<u>12282</u>	<u>1007</u>

ELISpot - Antigen 3:

Patient	Lw - 1	PHA - 1	Ag 3 - 1	Lw - 2	PHA - 2	Ag3 - 2
16 Spots	10	517	11	12	523	20
16 Aktivität	<u>81</u>	<u>11508</u>	<u>36</u>	<u>134</u>	<u>11983</u>	<u>292</u>
17 Spots	25	683	24	22	716	24
17 Aktivität	<u>173</u>	<u>11044</u>	<u>141</u>	<u>158</u>	<u>11165</u>	<u>192</u>
18 Spots	9	495	12	18	493	16
18 Aktivität	<u>79</u>	<u>11244</u>	<u>69</u>	<u>219</u>	<u>10707</u>	<u>166</u>
19 Spots	32	798	32	25	775	28
19 Aktivität	<u>507</u>	<u>17492</u>	<u>434</u>	<u>375</u>	<u>17632</u>	<u>342</u>
20 Spots	119	700	143	140	701	155
20 Aktivität	<u>3367</u>	<u>12075</u>	<u>4441</u>	<u>3429</u>	<u>11876</u>	<u>4359</u>
21 Spots	22	492	39	17	689	15
21 Aktivität	<u>269</u>	<u>9224</u>	<u>372</u>	<u>159</u>	<u>13086</u>	<u>79</u>
22 Spots	2	334	5	4	312	5
22 Aktivität	<u>8</u>	<u>4979</u>	<u>31</u>	<u>23</u>	<u>5404</u>	<u>18</u>
23 Spots	25	606	17	32	708	22
23 Aktivität	<u>238</u>	<u>12741</u>	<u>181</u>	<u>229</u>	<u>16277</u>	<u>228</u>
24 Spots	26	886	39	28	828	38
24 Aktivität	<u>419</u>	<u>14832</u>	<u>472</u>	<u>245</u>	<u>14587</u>	<u>488</u>
25 Spots	10	687	7	5	683	9
25 Aktivität	<u>65</u>	<u>14012</u>	<u>52</u>	<u>15</u>	<u>13650</u>	<u>74</u>
26 Spots	21	743	21	10	755	33
26 Aktivität	<u>148</u>	<u>15427</u>	<u>216</u>	<u>42</u>	<u>16323</u>	<u>277</u>

7.3. Selbstständigkeitserklärung

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....

Datum

.....

Unterschrift

7.4. Danksagung

Mein Dank gilt dem Direktor des Institutes für Klinische Immunologie, Herrn Prof. Dr. Frank Emmrich, für die Ermöglichung der Durchführung und Erstellung dieser Doktorarbeit.

Weiterhin möchte ich besonders meinem Doktorvater, Prof. Dr. Ulrich Sack, für die große fachliche Unterstützung bei dieser Arbeit danken.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern des Instituts für Klinische Immunologie, vor allem bei Frau Katrin Bauer und Frau Franka Kahlenberg, bedanken.

Meinen Eltern und Schwiegereltern danke ich herzlich für ihre fortwährende Unterstützung und Interesse an dieser Arbeit.

Für die unermüdliche Unterstützung, Liebe und Motivation bedanke ich mich vom ganzen Herzen bei meiner Frau Anja Zeuner.

7.5. Lebenslauf

Name: Thomas Zeuner